

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Diagnóstico Precoz de la Infección por VIH
en Niños y Monitorización de la Infección en
Población Adulta Infectada Usando
Muestras de Sangre Seca**

TESIS DOCTORAL

**Patricia Álvarez Muñoz
Madrid, 2016**

TESIS DOCTORAL

Diagnóstico Precoz de la Infección por VIH en Niños y Monitorización de la Infección en Población Adulta Infectada Usando Muestras de Sangre Seca

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares (Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias) en la Universidad Autónoma de Madrid por la licenciada en Biología:

Dña. Patricia Álvarez Muñoz

Directora de Tesis:

Dra. África Holguín Fernández

Doctora en Biología. Investigadora del Sistema Nacional de Salud. Responsable del Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1. Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

AGRADECIMIENTOS |

Quiero agradecerle al Dr. Rafael Cantón el haberme permitido formar parte de un Servicio de la calidad que tiene el de Microbiología y Parasitología del Hospital Ramón y Cajal en el cual me he sentido acogida desde el primer día. También a mis compañeros del Servicio por estar siempre dispuestos a echarme una mano en lo que haga falta.

Así mismo, quiero darle las gracias a la Dra. África Holguín, por darme una oportunidad que creía imposible y un proyecto con el que ilusionarme. Me quedo con su esfuerzo y su tenacidad a la hora de superar los obstáculos y su optimismo para afrontar nuevos retos.

A Antonio, Luis y Pablo por su paciencia infinita y por aceptarme en un proyecto en el que ha sido un honor poder participar.

A Gonzalo, Miguel, Leticia, Sandra, Teresa, Patricia Rojas, Carolina, Sara, Laura, Lucía, Marina y Ángel. Compañeros de laboratorio que me han dado más de una lección y de los que espero poder seguir aprendiendo.

A Esther, por su amistad incondicional. Si se me ha pegado una décima parte de su alegría, su dulzura y su dedicación, me puedo dar por satisfecha. Por ser un modelo de mujer trabajadora y, lo más importante, de persona y amiga.

A Javi, Gonzalo, David, María, Alex, Guille, Tamara, Ux, Bea, Mati, Gloria y Rubén por estar ahí desde el principio, cuando la idea de hacer esta Tesis ni siquiera existía.

A mis abuelas que, siendo tan distintas, ejemplifican los valores tan importantes de fuerza, cariño, confianza e independencia. No me darán el premio Nobel, pero ellas me han hecho creer que no era imposible. También a mis tíos y primos por recordarme que hay cosas más importantes que el trabajo. Por obligarme a desconectar, a jugar y a pintarme las uñas de todos los colores.

A mis padres, simplemente por todo. Por darme fuerza en los momentos difíciles y acompañarme en la celebración de los buenos. Por estar ahí siempre y, a la vez, darme mi espacio. Por su orientación, su apoyo, su confianza y su amor. Este trabajo, estos cuatro años, son tan suyos como míos.

ABREVIATURAS |

μl	microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARV	Antirretroviral(es)
bDNA	<i>Branched DNA</i>
CCI	Coeficiente de correlación intraclase
cp/ml	Copias de ARN del VIH-1 por mililitro
CRF	Forma(s) recombinante(s) circulante(s)
CV	Carga viral
DBS	<i>Dried blood spots</i> o muestras de sangre seca
DE	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos de América
ELISA	Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
IAS-USA	Sociedad Internacional sobre el sida de EE. UU.
IC	Intervalo de confianza
IP	Inhibidores de la proteasa
IN	Integrasa
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)ido
ITS	Infecciones de transmisión sexual
kb	Kilobases
kPCR	<i>VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay</i>
Log₁₀	Logaritmo decimal
LTR	Repeticiones largas terminales
m	Minutos
ml	Mililitros

MDR	Mutaciones de resistencia
MRA	Mutaciones de resistencia adquiridas
MRT	Mutaciones de resistencia transmitidas
NASBA	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i>
NAT	<i>Nucleic acid test</i>
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NS	Estadísticamente no significativo
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	p-valor
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Proteasa
PTMH	Programa de prevención de la transmisión del VIH de madre a hijo
qPCR	PCR a tiempo real
Roche-CV-v2	Roche CAP/CTM Quantitative Test v2.0
Roche-dx-v1	Roche CAP/CTM Qualitative Test v1.0
Roche-dx-v2	Roche CAP/CTM Qualitative Test v2.0
RIQ	Rango intercuartílico
s	Segundos
sida	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TAR	Tratamiento antirretroviral
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TI	Transcriptasa inversa
URF	Forma(s) recombinante(s) única(s)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia del simio
WB	<i>Western blot</i>

FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES FRENTE AL VIH

Inhibidores de la proteasa ("/r" indica coadministración con ritonavir en baja dosis como potenciador farmacológico)

ATV	Atazanavir sulfato
DRV	Darunavir
FPV	Fosamprenavir cálcico
IDV	Indinavir sulfato
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
TPV	Tipranavir

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AZT/ZDV	Zidovudina
d4T	Estavudina
FTC	Emtricitabina
TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
TAF	Tenofovir alafenamida

Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)ido

EFV	Efavirenz
ETV	Etravirina
NVP	Nevirapina
RPV	Rilpivirina hidrocloreuro

Inhibidores de la integrasa (INI)

RAL	Raltegravir
EVG	Elvitegravir
DTG	Dolutegravir

Inhibidores de la fusión (IFI)

ENF Enfuvirtida

Inhibidores CCR5 o inhibidores de la entrada

MVC Maraviroc

AMINOÁCIDOS

A Alanina

C Cisteína

D Ácido aspártico

E Ácido glutámico

F Fenilalanina

G Glicina

H Histidina

I Isoleucina

K Lisina

L Leucina

M Metionina

N Asparagina

P Prolina

Q Glutamina

R Arginina

S Serina

T Treonina

V Valina

W Triptófano

Y Tirosina

X

ÍNDICE |

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Resumen en Inglés.....	1
Introducción.....	5
Biología del VIH	7
Diversidad Genética del VIH	9
Variantes Genéticas del VIH	9
Implicaciones de la Presencia de Variantes No-B del VIH-1.....	11
Epidemiología del VIH.....	13
Curso Natural de la Infección	13
Diagnóstico de la Infección por VIH en Población Pediátrica.....	15
Limitaciones del Diagnóstico Molecular en Niños.....	17
Muestras de Sangre Seca (DBS, Dried Blood Spots)	19
Generalidades del Tratamiento Antirretroviral	20
Transmisión Vertical y Programas PTMH en Guinea Ecuatorial.....	22
Objetivos	25
Capítulo 1	29
Antecedentes	31
Materiales y métodos	31
Resultados	34
Discusión	41
Capítulo 2	43
Antecedentes	45
Materiales y Métodos	45
Resultados	49
Discusión	56
Capítulo 3	61
Antecedentes	63
Materiales y Métodos	63
Resultados	67
Discusión	72
Capítulo 4	79
Antecedentes	81
Materiales y Métodos	81
Resultados	83
Discusión	88

Discusión Integradora.....	93
Conclusiones.....	97
Bibliografía	101
Anexo I	121
Anexo II	125
Anexo III	129
Anexo IV.....	133
Anexo V.....	139

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I.1. Métodos directos para la detección de la infección por VIH-1	16
Tabla I.2. Indicaciones actuales del PCR como diagnóstico del VIH	17
Tabla 1.1. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR.....	34
Tabla 1.2. Características epidemiológicas y datos de CV de los 62 pacientes incluidos en el estudio.	35
Tabla 1.3. Concordancia en la detección del ARN viral entre plasma y DBS según dos umbrales de detección.....	39
Tabla 1.4. Diferencia media entre los resultados obtenidos por kPCR usando muestras pareadas de plasma/DBS de 56 pacientes <i>naïve</i> con secuencia disponible según la variante del VIH-1	40
Tabla 2.1. Características de la población de estudio.....	46
Tabla 2.2. Rendimiento de dos ensayos de cuantificación de la CV (kPCR y Roche-CV-v2) testando diferentes variantes del VIH-1 en DBS	48
Tabla 2.3. Detección y cuantificación del VIH-1 en 176 DBS según el estatus de infección por VIH-1 y la exposición a TAR en el momento de toma de muestra.....	50
Tabla 2.4. Sensibilidad y especificidad de las dos técnicas de CV para la detección de VIH-1 en 176 DBS	52
Tabla 2.5. Cuantificación del VIH-1 en 176 DBS por las dos técnicas según su carga viral.....	54
Tabla 3.1. Características de las técnicas virológicas comerciales	65
Tabla 3.2. Resultados del diagnóstico molecular del VIH-1 en el primer DBS de la población de estudio.....	69
Tabla 4.1. Características epidemiológicas y virológicas de la población de estudio. .	85
Tabla 4.2. Características epidemiológicas y virológicas de las 8 mujeres infectadas por virus resistentes.....	86
Tabla 4.3. Variantes del VIH-1 del grupo M descritas en pacientes de Guinea Ecuatorial durante 1997-2013.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I.1. Estructura del virión (A) y genoma del VIH (B)	7
Figura I.2. Ciclo replicativo del VIH	8
Figura I.3. Clasificación de las variantes del VIH.....	10
Figura I.4. Distribución global de los subtipos y recombinantes del grupo M del VIH-1 entre 2004-2007.	11
Figura I.5. Curso natural de la infección por VIH.....	14
Figura 1.1. Análisis de concordancia entre plasma y DBS mediante el método Bland-Altman.	39
Figura 2.1. Curvas ROC para Roche-CV-v2 y kPCR. La línea diagonal sirve como referencia, donde la sensibilidad es igual a 1-especificidad	53
Figura 2.2. Análisis de concordancia Bland-Altman entre kPCR y Roche-CV-v2	55
Figura 3.1. Diagrama de flujo de las visitas de seguimiento según el protocolo PTMH de Guinea Ecuatorial	68
Figura 3.2. Resultados positivos y discrepantes del diagnóstico molecular y serológico del VIH-1.....	70

RESUMEN EN INGLÉS |

Dried blood specimens (DBS) represent an alternative sample type to liquid plasma for performing HIV-1 diagnostic techniques and monitoring antiretroviral therapy (ART) efficacy as they are easy to prepare, less biohazardous, do not require a cold chain, and can be shipped by standard mail at room temperature to a reference laboratory if required.

In this Thesis, different studies focusing on the use of DBS as sample type to diagnose HIV-1 infection in infants, to quantify the HIV-1 viral load (VL), and to identify drug resistance mutations and HIV-1 variants are presented. A molecular epidemiological approach was used to analyze the results based on the different HIV-1 subtypes and recombinants included in the studies. Our results confirm that DBS can be used for HIV-1 VL quantification and for the detection of drug resistant mutations (DRM) in viruses, which can be useful for early therapeutic failure detection in treated subjects. However, VL in DBS can be overestimated in specimens with low VL in plasma, maybe due to a higher effect of proviral DNA in quantification. Considering that different VL assays provide different VL values for the same specimen, the use of the same VL technique for each patient during ART monitoring is recommended. Commercial VL assays using DBS were useful for early infant diagnosis, although discrepant results among the four assays analyzed in this Thesis were common. Further research is required to reduce false positive results that could result in wrong diagnosis and unneeded treatment. VL assays should also increase their sensitivity and specificity to avoid overestimated HIV-1 quantifications, which could be interpreted as virological failure events, or false negative diagnostic results due to genetic variability. As to the identification of DRM using DBS, the high rate of acquired drug resistance to retrotranscriptase inhibitors observed among pretreated pregnant women reinforces the importance of systematic DRM monitoring in countries as Equatorial Guinea to reduce HIV-1 resistance transmission and to optimize first and second-line ART regimens when DRM are present.

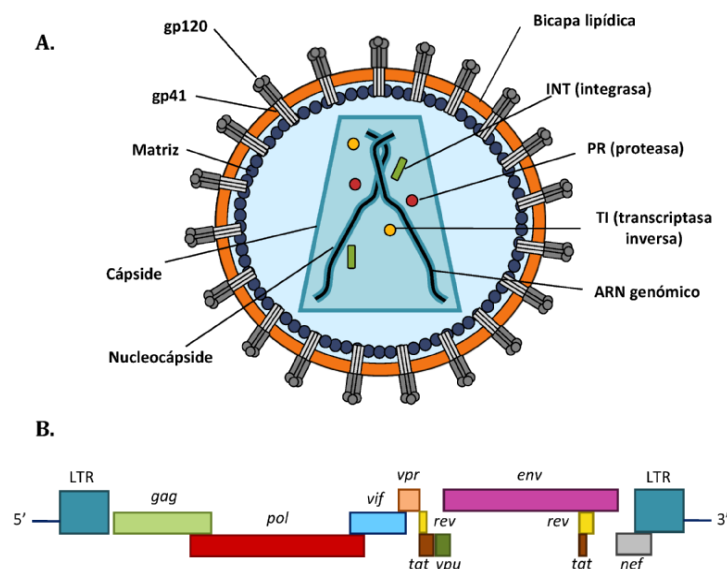
In summary, DBS collection is especially useful in settings with limited infrastructures or when low blood volume is available, as in infants. HIV-1 VL testing is useful for monitoring the efficacy of ART, detecting early therapeutic failure events, and performing an early infant diagnosis of the HIV infection. More studies including more HIV-1 variants are needed to define the performance of commercial virological assays when using DBS.

INTRODUCCIÓN |

BIOLOGÍA DEL VIH

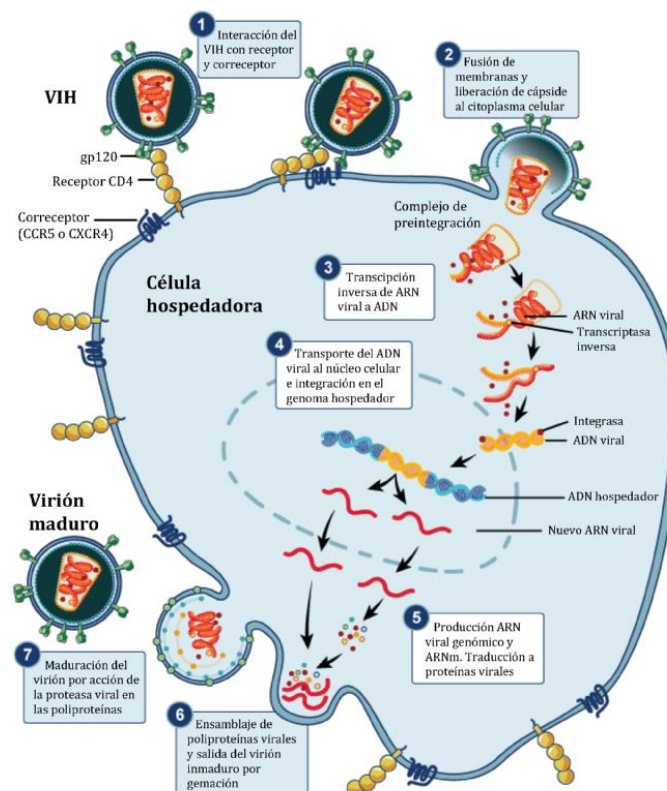
El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente infeccioso causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). Es un virus ARN de la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) y del género *Lentivirus* (Barre-Sinoussi et al. 1983). El virión tiene forma esférica y está formado por una envoltura externa o bicapa lipídica tomada de la membrana de la célula humana infectada donde se inserta la glicoproteína Gp120 unida a la glicoproteína transmembrana Gp41 en forma de trímeros. Bajo la envoltura se sitúa la matriz proteica y dentro se encuentra la cápside icosaédrica con las enzimas virales y el material genético del virus formado por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8 kb asociadas a proteínas de la nucleocápside (Muesing et al. 1985). El genoma del VIH contiene tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica principalmente las proteínas estructurales que conforman la matriz, la cápside y la nucleocápside, mientras que el gen *pol* codifica las proteínas virales proteasa (PR), transcriptasa inversa (TI) e integrasa (IN) que participan en la maduración viral, en la síntesis de ADN a partir del ARN del virus y en su integración en el genoma celular, respectivamente. El gen *env* codifica el precursor de las glicoproteínas de la envoltura. El VIH-1 posee otros genes con capacidad reguladora (*tat*, *vif*, *vpr*, *vpu*, y *nef*) (Gallo et al. 1988; Emerman & Malim 1998), esenciales para el ciclo viral. En los extremos 5' y 3' del genoma se encuentran repeticiones largas terminales (LTR), que permiten su circularización e integración en el genoma celular. La estructura y organización genética del VIH se muestran en la **Figura I.1.**

Figura I.1. Estructura del virión (A) y genoma del VIH (B).



El ciclo infeccioso y de replicación tiene varias etapas (**Figura I.2**). 1) Interacción entre el virión y su célula diana (principalmente linfocitos T CD4+). 2) Fusión de la envuelta del virión con la membrana celular. Una vez dentro, la cápside se desensambla y libera el genoma viral en el citoplasma. 3) Transcripción inversa del ARN viral. El ADN proviral sintetizado se acopla a una serie de factores celulares y virales formando el complejo de preintegración. 4) Transporte de este complejo al núcleo donde, por acción de la IN viral y las secuencias LTR, se integra en el genoma celular formando la forma proviral del VIH que puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o replicar masivamente lisando la célula infectada. 5) Replicación del VIH que comienza con la transcripción del ADN proviral usando la maquinaria celular, produciendo ARN genómico viral y ARNm viral requerido para la síntesis de proteínas virales. La traducción genera poliproteínas que deben procesarse en fragmentos funcionales. 6) Las proteínas virales procesadas son ensambladas y ocurre la salida por gemación del virus a través de la membrana celular. 7) Maduración por la PR viral que procesa las poliproteínas precursoras para formar el virión infeccioso (Levy 1993).

Figura I.2. Ciclo replicativo del VIH.



Adaptado del *National Institutes of Allergy and Infectious Diseases*, EE.UU. (National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) HIV Replication Cycle <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp ID#: 18162>).

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIH

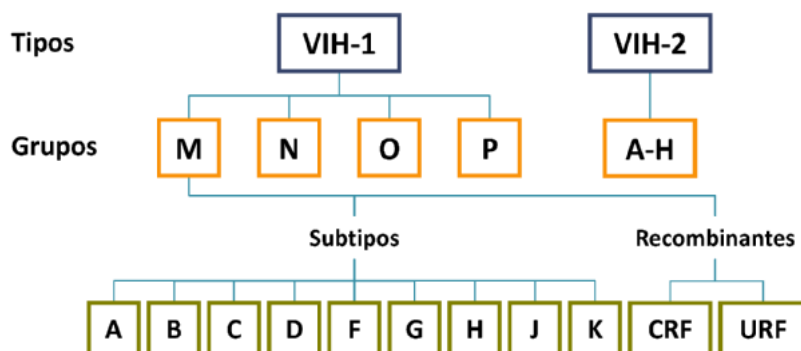
Una de las principales características del VIH es su gran heterogeneidad genética, que surge como resultado de la combinación de su alta tasa de replicación y sus elevadas tasas de mutación y recombinación. Se calcula que se producen y destruyen entre 10^{10} y 10^{12} nuevos viriones cada 2,5 días, que es el tiempo transcurrido entre generaciones virales (Perelson et al. 1996). Mientras tanto, por cada ciclo replicativo y cadena de ARN viral se producen, aproximadamente, de 1 a 10 cambios de media y de 2 a 3 eventos de recombinación (Jetzt et al. 2000; Zhuang et al. 2002). Dichas mutaciones permanecen en el genoma ya que la TI carece de actividad correctora de errores. Dentro de un individuo infectado el virus se organiza como una población altamente heterogénea de distintas variantes. Esta estructura poblacional, denominada “cuasiespecie viral”, se caracteriza por un proceso constante de generación de mutantes por la competición entre ellos y por la acción de eventos de selección positiva y/o negativa en las variantes generadas. Finalmente el genoma o los genomas virales con mayor eficacia biológica serán los dominantes, quedando rodeado de un amplio espectro de mutantes (variantes minoritarias) con un extenso rango de fenotipos (Briones & Domingo 2008). La extraordinaria variabilidad genética del VIH tiene implicaciones clínicas y epidemiológicas importantes (Rouet et al. 2007; Geretti et al. 2009). Asimismo, estos viriones pueden presentar un amplio rango de fenotipos respecto a virulencia, tropismo celular, velocidad de replicación, composición antigénica y susceptibilidad a los fármacos antirretrovirales (ARV), dando al virus la capacidad de escapar al sistema inmune y al tratamiento antirretroviral (TAR).

VARIANTES GENÉTICAS DEL VIH

La variabilidad del virus se traduce en la aparición de numerosas variantes (**Figura I.3**), que son el objeto de estudio de la epidemiología molecular. Basándose en su homología genética, el VIH se clasifica en dos tipos: 1 y 2 (Clavel et al. 1986; Robertson et al. 2000). El VIH-1 es el más extendido y responsable de la mayoría de infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2, identificado en 1986 (Clavel et al. 1986), es más cercano filogenéticamente al virus de inmunodeficiencia del simio (VIS) que al VIH-1, parece ser menos patógeno y menos transmisible. El VIH-1 ha sido clasificado en cuatro grandes grupos: grupo M (*main* o principal), grupo O (*outlier* o externo), grupo N (no-M, no-O) y el grupo P. Los grupos O, N y P presentan baja prevalencia y están restringidos a África subsahariana occidental y central o a casos aislados originarios de esa región. Sólo el grupo M se ha expandido desde África al resto de continentes. Los virus del grupo M han sido subdivididos en nueve subtipos

denominados por letras (A, B, C, D, F, G, H, J, K) (Robertson et al. 2000) y en recombinantes entre ellos, que llevan fragmentos genómicos de distintos subtipos de los viriones parentales. Estas formas recombinantes pueden ser circulantes (CRF, *circulating recombinant forms*) o únicas (URF, *unique recombinant forms*). Los CRF son recombinantes entre subtipos con secuencia completa y puntos de recombinación comunes y que han sido reconocidos en más de tres individuos infectados y no relacionados epidemiológicamente. Hasta el momento se han descrito 79 CRF (**Anexo I**), identificados por un número y por los subtipos genéticos presentes en su genoma. Los URF son recombinantes intersubtipo encontrados en individuos aislados, con puntos de recombinación entre subtipos diferentes a los de los CRF conocidos, lo que no permite agruparlos con ellos. Si los URF se transmiten sucesivamente y se extienden entre la población, pueden dar lugar a nuevos CRF.

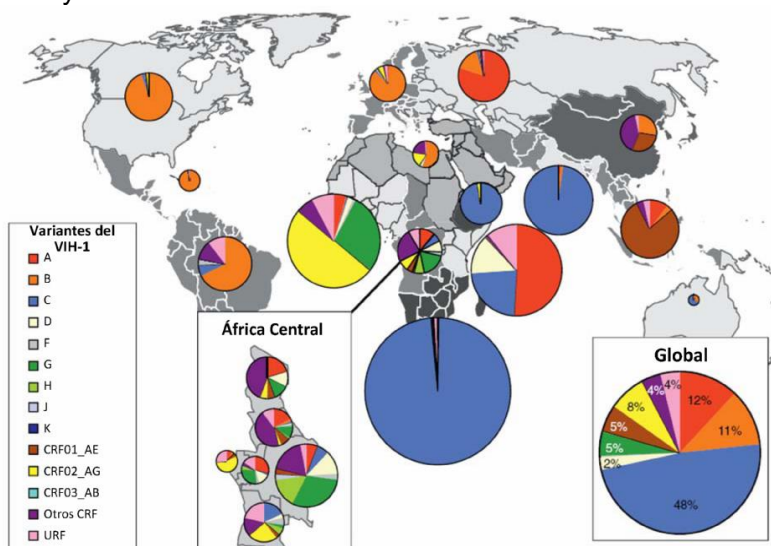
Figura I.3. Clasificación de las variantes del VIH.



La distribución mundial de las distintas variantes dentro del grupo M del VIH-1 es heterogénea (Hemelaar et al. 2011) (**Figura I.4**). El subtipo B del grupo M del VIH-1, representa únicamente el 11% de las infecciones en el mundo pero predomina en Europa occidental, Estados Unidos de América (EE.UU.) y Canadá. Por ello es la variante más estudiada y usada para el diseño y desarrollo de ARV, vacunas, ensayos diagnósticos y gran parte de la investigación básica. Una de las consecuencias de los movimientos poblacionales por intercambios comerciales, migración y turismo ha sido la introducción de variantes no-B del VIH-1 en pacientes inmigrantes y autóctonos en países desarrollados donde predominaba el subtipo B. Al resto de subtipos y formas recombinantes del grupo M del VIH-1 se les denomina “variantes no-B” del VIH-1 y son responsables del 89% de los 37 millones de infectados a nivel mundial. Así, en África central, por ser el epicentro de la pandemia, coexisten un gran número de variantes del VIH-1. La forma recombinante CRF02_AG es el CRF más prevalente y el más frecuente en África occidental mientras que el subtipo C predomina entre los no-B y prevalece en África del sur y oriental y en India. Actualmente han ocurrido brotes

epidémicos causados por ciertos CRF en algunas partes del mundo (Kouri et al. 2015; Patiño Galindo et al. 2015).

Figura I.4. Distribución mundial de los subtipos y algunas formas recombinantes del VIH-1 entre 2004 y 2007.



Adaptado de Hemelaar et al. 2011.

IMPLICACIONES DE LA PRESENCIA DE VARIANTES No-B DEL VIH-1

La correcta identificación de subtipos y formas recombinantes del VIH-1 es de gran relevancia para entender problemas potenciales en el diagnóstico genético y serológico (Aghokeng et al. 2009), en el uso de TAR (Holguín et al. 2006a), en la cuantificación de la viremia (Gottesman et al. 2004; Rouet et al. 2007; Holguín et al. 2008b), en la interpretación genotípica de las mutaciones de resistencia (MDR) (Gonzalez et al. 2003; Grossman et al. 2004; Yebra et al. 2010) y para comprender la prognosis de la enfermedad (Pant Pai et al. 2012) o fallos en la eficacia de vacunas (Korber & Gnanakaran 2009). A nivel poblacional, la cocirculación de múltiples cepas en una misma región geográfica dificulta la creación de vacunas específicas para las variantes circulantes en cada región ante la imposibilidad de desarrollar inmunidad frente a un amplio rango de variantes (Barouch 2008; Korber & Gnanakaran 2009; deCamp et al. 2014). Pacientes infectados por ciertos subtipos no-B presentan una progresión acelerada de la enfermedad (Vasan et al. 2006; Baeten et al. 2007; Pant Pai et al. 2012; Kouri et al. 2015) y tasas de transmisión diferente (Kiwanuka et al. 2009). Ciertas variantes no-B presentan sustituciones específicas en posiciones relacionadas con resistencias a los ARV (Kantor & Katzenstein 2003; Liácer Delicado et al. 2016) que pueden alterar la aparición de mutaciones de resistencia en esas posiciones o en otras adyacentes, bien acelerando su emergencia (Brenner et al.

2006) o bien induciendo vías alternativas de adquisición de estas mutaciones (Grossman et al. 2004; Gonzalez et al. 2008). Ciertas variantes no-B necesitan acumular menos cambios nucleotídicos en las regiones codificantes de PR, TI e IN que el subtipo B para desarrollar una MDR debido a los diferentes codones que presentan estas variantes (Martínez-Cajas et al. 2008). También polimorfismos naturales muy comunes en la PR de diferentes variantes no-B pueden mejorar la capacidad replicativa viral *in vitro* (Holguín et al. 2006b), reducir la barrera genética (número de mutaciones que el virus necesita acumular para desarrollar resistencia) de algunos fármacos IP (de Vijver et al. 2005), afectar a la afinidad de unión entre fármaco y su sustrato (Kinomoto et al. 2005), a los algoritmos de interpretación de resistencia genotípica y a las herramientas automatizadas de subtipaje viral (Snoeck et al. 2006; Yebra et al. 2011). A pesar de todo esto, existe buena respuesta virológica e inmunológica al TAR en pacientes con subtipos no-B (Holguín et al. 2006a; Geretti et al. 2009).

Aunque los inmunoensayos de última generación pueden detectar todos los subtipos del grupo M del VIH-1, el grupo O y el VIH-2, en regiones con recursos limitados donde ocurren la mayoría de las infecciones y circulan una gran cantidad de variantes distintas del virus las pruebas diagnósticas son menos eficientes (Aghokeng et al. 2009). La detección directa del virus mediante PCR empleada en la cuantificación de la carga viral (CV) o en el diagnóstico molecular precoz del VIH-1 requiere sondas y cebadores específicos para amplificar la región diana del virus. Estos, al estar diseñados principalmente para detectar cepas del subtipo B, pueden ser responsables de falsos negativos en pruebas diagnósticas de ciertos subtipos no-B o recombinantes complejos genéticamente diferentes de la cepa B. El seguimiento clínico de la enfermedad mediante la detección de resistencias o la estimación de la CV también se puede ver afectado por la variabilidad del virus, ya que ciertas variantes pueden cuantificarse incorrectamente o incluso no detectarse (Gottesman et al. 2004; Rouet et al. 2007; Aghokeng et al. 2011; Tatarelli et al. 2016). Incluso la cuantificación de la CV de la misma muestra con distintas técnicas puede ser discordante (Von Truchsess et al. 2006; Holguín et al. 2008b; Ruelle et al. 2009; Troppan et al. 2009; Rouet et al. 2011; Mouinga-Ondémé et al. 2014), como ocurre en otros virus ARN (Kessler et al. 2013). Por ello, es esencial una adecuada detección y descripción de las variantes del VIH-1 en cohortes. Su caracterización debe realizarse mediante análisis filogenético (AF) de secuencias genéticas virales, ya que las técnicas de subtipaje *online* pueden presentar importantes limitaciones para identificar algunas

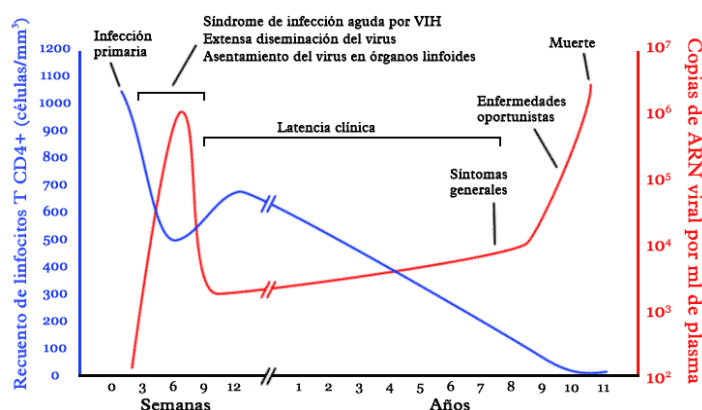
variantes distintas del subtipo B, principalmente ciertos recombinantes (Yebra et al. 2011).

EPIDEMIOLOGÍA DEL VIH

A finales de 2015, cerca de 37 millones de personas vivían infectadas por el VIH en todo el mundo, siendo 1,8 millones niños menores de 15 años (UNAIDS 2016a) y siendo África subsahariana la región más afectada, con 25,6 millones de infectados y el 70% de las nuevas infecciones (UNAIDS 2016a). En Europa, el número de casos de sida sigue reduciéndose por el mayor acceso y eficacia del TAR. En 2014 se comunicaron casi 30.000 nuevos casos de infección por VIH en la Unión Europea y el Espacio Económico Europeo (European Centre for Disease Prevention and Control 2016). En España, se notificaron 84.679 casos de sida desde el inicio de la epidemia hasta 2014 (SINIVIH 2015), presentando similares tasas de nuevos diagnósticos de VIH a las de otros países de la región europea de la Organización Mundial de la Salud (OMS), pero superiores a la media de países de Europa Occidental y Unión Europea (SINIVIH 2015). Por movimientos poblacionales, intercambios comerciales, migración y turismo pueden introducirse variantes no-B del VIH-1 en pacientes inmigrantes y autóctonos en países desarrollados donde predominaba el subtipo B. Así, las infecciones por subtipos no-B y formas recombinantes del VIH-1 está aumentando entre los nuevos diagnósticos en Europa (Beloukas et al. 2016), alcanzando incluso el 50% en Francia, Bélgica y Suecia (Frange et al. 2008; Vercauteren et al. 2009; Descamps et al. 2010; Von Wyl et al. 2011; Neogi et al. 2014). En España, la proporción de variantes no-B también está en alza, suponiendo el 10-15% de las infecciones por VIH (Holguín et al. 2008a; González-Alba et al. 2011; Yebra et al. 2013b; Pernas et al. 2014; Ambrosioni et al. 2015). Aunque la variante no-B más frecuente en España es el CRF02_AG, se han detectado casos de infección por todos los subtipos no-B del VIH-1 y múltiples formas recombinantes incluyendo recombinantes complejos (Holguín et al. 2008c). De hecho en España, una de cada 10 nuevas infecciones en adultos es por variantes no-B y 7 de cada 10 infecciones causadas por variantes no-B ocurren por cepas recombinantes (Yebra et al. 2012).

CURSO NATURAL DE LA INFECCIÓN

La infección por VIH transcurre como una infección viral persistente que causa replicación viral y enfermedad crónica (Liu et al. 1997). Se pueden diferenciar varias fases de la infección por el VIH, identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos (**Figura I.5**).

Figura I.5. Curso natural de la infección por VIH.

La fase aguda, o infección primaria, se inicia en el momento del contagio. Durante el “periodo ventana” se produce una replicación masiva del virus dentro del organismo hasta alcanzar CV muy elevadas, infectando a células expuestas y a ganglios linfáticos. Después ocurre la fase crónica o de latencia clínica, coincidiendo con la aparición de la respuesta inmune y producción de anticuerpos (seroconversión). En ella el portador es asintomático, ya que el sistema inmune tiene una gran capacidad para regenerar las células destruidas por el virus, aunque la infección viral termina por desgastar al sistema inmunológico. En ausencia de TAR, la mayoría de los pacientes desarrollan sida en 5-10 años al mantener CV elevadas y deterioro del sistema inmune. En esta etapa crítica final de la infección por VIH el portador posee un sistema inmunológico muy debilitado y por ello baja su capacidad de reacción ante otras enfermedades e infecciones oportunistas que le pueden conducir a la muerte.

La progresión de la enfermedad puede variar debido a factores asociados al virus y a factores genéticos e inmunológicos del hospedador, existiendo progresores rápidos y lentos (Crowell & Hatano 2015; Merindol & Berthoux 2015; Rodríguez-Da Silva et al. 2015). La mayoría de niños se infectan por transmisión vertical, en una etapa de pleno desarrollo y diferenciación celular. El VIH provoca un grave trastorno de la inmunidad, que se manifiesta clínicamente por infecciones graves y por una mayor predisposición para el desarrollo de algunas neoplasias (European Collaborative Study 1991). Los niños presentan una progresión a sida más rápida en ausencia de TAR (Blanche et al. 1990; Frederick et al. 1994; Mayaux et al. 1996) y una supervivencia media entre 7 y 8 años (Tovo et al. 1992; Blanche et al. 1997), así como mayor riesgo de padecer fracaso virológico a los cinco años de comenzar el TAR que es el doble que en adultos (Pursuing Later Treatment Options II (PLATO II) project team for the Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE) et al. 2011).

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VIH EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

En niños nacidos de madres con VIH, el diagnóstico precoz de la infección es esencial para instaurar el TAR lo antes posible y reducir así la mortalidad y la morbilidad asociadas a la infección (Newell et al. 2004; Violari et al. 2008; Picat et al. 2013). Puesto que la infección por VIH es asintomática o cursa con sintomatología inespecífica durante los 2-3 primeros meses de vida, el diagnóstico precoz del VIH debe basarse en pruebas de laboratorio. En niños mayores de 18 meses se realiza mediante técnicas serológicas al igual que en el adulto (WHO 2014). Sin embargo, las técnicas directas son imprescindibles para el diagnóstico del VIH en niños menores de 18 meses expuestos a la infección durante el embarazo, parto o lactancia materna al nacer de una mujer seropositiva (WHO 2010b). Los niños menores de esta edad no producen sus propios anticuerpos hasta que su sistema inmune madura. Ya que los anticuerpos de la madre pueden persistir en ellos hasta los 15-18 meses, o incluso más (Chantry et al. 1995), los niños podrían mantener anticuerpos maternos hasta el primer año y medio de vida sin estar infectados por VIH. Por eso, en ellos el diagnóstico serológico no es útil al presentar el mismo patrón de anticuerpos frente al VIH que su madre seropositiva.

Existen diferentes metodologías para realizar el diagnóstico directo de la infección por VIH-1 (**Tabla I.1**). Estas técnicas virológicas comerciales deben tener una sensibilidad al menos del 95% (ideal >98%) y una especificidad mayor del 98% (WHO 2010b), aunque deberían aumentar su especificidad en zonas donde la cobertura de TAR maternal y la profilaxis infantil es alta (WHO 2014). No obstante, hasta la fecha, la OMS no ha mencionado ninguna técnica como referencia (*gold standard*) en sus guías (WHO 2010a; WHO 2010b; WHO 2013; WHO 2014). El test Amplicor HIV-1 DNA (Roche) se ha utilizado ampliamente para diagnóstico precoz y se ha considerado el *gold standard* (Stevens et al. 2008), pero se ha reemplazado progresivamente por nuevos ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (qPCR) para el diagnóstico precoz del VIH-1 (Fiscus et al. 2013; Ceffa et al. 2016).

En España las guías de consenso del 2014 para el seguimiento de la infección por el VIH en relación con la reproducción, embarazo, parto y profilaxis de la transmisión vertical del niño expuesto recomiendan como test virológico para el diagnóstico perinatal la prueba de la PCR a partir de ADN proviral, cuya sensibilidad aumenta con la edad y/o la PCR cuantitativa que detecta RNA viral libre en plasma, siendo esta técnica la que se usa en la mayoría de los centros (Panel de Expertos de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA),

Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) 2014). Se recomienda la determinación de ARN y/o ADN viral en las primeras 48 horas de vida (no utilizar sangre de cordón) y repetir la determinación de ARN viral y/o ADN proviral entre los 15-21 días de vida, a las 4 ó 6 semanas de vida y ≥ 4 meses.

Tabla I.1. Métodos directos para la detección de la infección por VIH-1.

<p>1. Detección molecular del material genético del virus (ARN viral o ADN proviral) (NAT)</p> <p>1.1 Técnicas cualitativas (detecta presencia o ausencia de virus): Amplificación por PCR (convencional o a tiempo real)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5 (Roche) - COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Qualitative Test v1 y v2 (Roche) - Real Time RUO Qualitative HIV-1 (Abbott) <p>1.2. Técnicas cuantitativas:</p> <p>1.2.1. Basadas en amplificación de ácidos nucleicos empleando PCR a tiempo real:</p> <ul style="list-style-type: none"> - COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Quantitative Test v 2.0 (Roche) - RealTime HIV-1 m2000 (Abbott) - Versant HIV RNA 1.0 (kPCR) (Siemens) - Artus™ HIV-1 QS-RGD (Qiagen) <p>1.2.2. Basadas en amplificación de ácidos nucleicos empleando tecnología NASBA:</p> <ul style="list-style-type: none"> - NucliSens EasyQ HIV-1 v2.0 (bioMérieux) <p>1.2.3. Basados en la amplificación de una señal unida a moléculas de ARN viral o bDNA:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Versant HIV-1 RNA v3.0 (Siemens)
2. Cultivo del virus
<p>3. Detección de antigenemia (antígeno p24 viral)</p> <ul style="list-style-type: none"> - HIV-1 p24 Ultra ELISA (Perkin Elmer)
<p>4. Detección de la actividad transcriptasa inversa viral</p> <ul style="list-style-type: none"> - ExaVir Load versión 3.0 (Cavidi)

Tabla cedida por la Dra. África Holguín de su capítulo "Epidemiología Molecular del VIH" Master en SIDA, Proyecto Esther, 2016. NAT, *nucleic acid tests* ; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; NASBA, *nucleic acid sequence based amplification*; bDNA, *branched DNA*.

La OMS recomienda que todos los niños expuestos menores de 18 meses realicen técnicas de detección de ARN viral o ADN proviral a las 4-6 semanas de vida para el diagnóstico precoz de la infección por VIH y que sea posteriormente confirmado en otra muestra también por técnicas moleculares, aunque no especifica una técnica concreta. En niños mayores de 18 meses un test serológico positivo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) confirmado por un ensayo confirmatorio (*western blot* o WB) implica un diagnóstico positivo (WHO 2010b). Los niños no infectados que reciben lactancia materna de sus madres infectadas están en riesgo de

infectarse. Por ello, la OMS recomienda realizar test diagnósticos moleculares al menos 6 semanas después de haber cesado la lactancia materna, pero se puede realizar diagnóstico molecular si está aún lactando (WHO 2014). Si el test molecular es positivo, debería confirmarse por una técnica molecular en otra nueva muestra. En caso de ser negativo durante la lactancia, no se puede asegurar la ausencia de infección porque el niño tiene riesgo de infección mientras siga lactando. Si el niño nunca ha lactado, un test serológico negativo en niños mayores de 9 meses descartaría la infección. Sin embargo, si ha lactado habrá que repetir el test al menos tras 6 semanas tras terminar la lactancia.

Existen varias situaciones en las que la PCR resulta imprescindible para el diagnóstico de la infección por VIH (**Tabla I.2**). En esos casos la PCR logra un diagnóstico más rápido y precoz de la infección VIH en situaciones en las que el diagnóstico clásico serológico puede tardar en confirmarse. El grado de estandarización de estas pruebas y la disponibilidad de reactivos no siempre es igual en los distintos países. Hasta el momento, existen reactivos comercializados para PCR diagnóstica de VIH-1 pero no para el VIH-2.

Tabla I.2. Indicaciones actuales del PCR como diagnóstico del VIH.

1. En recién nacido de madres infectadas por VIH o con antecedentes de riesgo de infección VIH durante el embarazo.
2. Para confirmar la infección en niños seropositivos menores de 18 meses.
3. En sujetos con patrón serológico indeterminado.
4. Para demostrar infecciones por VIH-2 con serología no concluyente o coinfecciones VIH-1/VIH-2.
5. En sujetos con infección aguda que todavía no han desarrollado anticuerpos frente el VIH.

LIMITACIONES DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN NIÑOS

Existen varios factores que pueden afectar a la eficacia de las técnicas diagnóstico molecular basadas en la amplificación del material genético viral para el diagnóstico precoz de la infección del VIH en niños. Entre ellas están el momento de adquisición del VIH en el niño, la CV de la muestra, la variabilidad genética del VIH-1, el tipo de muestra, el volumen empleado en el ensayo, el límite de detección de la técnica usada y la tasa de transmisión vertical de VIH-1 en la población a estudiar.

- **Influencia del momento de adquisición de la infección en el niño.** Los niños pueden infectarse con VIH-1 durante el embarazo, parto, lactancia materna y por transmisión sexual o parenteral. Los niños infectados en el útero generalmente tienen CV detectable en el nacimiento y progresan a la enfermedad más rápidamente. Los infectados cerca o durante el parto tardan más tiempo en tener virus detectable (Lambert et al. 2003). Por ello, la sensibilidad de los métodos moleculares es menor si se realiza la prueba más cerca al momento del nacimiento. En niños infectados en el útero se puede detectar ARN viral y ADN proviral en sangre a las 48 horas de nacer, pero si se infectan en el parto pueden tardar de 1 a 2 semanas en ser detectables (Havens & Mofenson 2009). En general, a las 6 semanas de edad se debería detectar el virus (técnicas ultrasensibles de p24, ARN viral, ADN proviral) en casi todos los niños infectados en el parto.

- **Influencia de la carga viral.** La detección del ARN viral y del antígeno p24 depende de la replicación viral, que se inhibe por el TAR. Aunque se espera que el niño infectado tenga una alta CV, si el niño ha recibido profilaxis al nacer puede que su viremia se haya reducido a valores por debajo del límite de detección de las técnicas moleculares. Ello podría originar falsos negativos en el diagnóstico virológico. Por eso, para el diagnóstico precoz en neonatos expuestos suele ser más frecuente hacer ensayos moleculares que detecten el ADN proviral en las primeras 4-6 semanas de vida. Además, al comparar distintas técnicas virológicas se ha visto como disminuye la correlación entre dichas técnicas cuando la CV es baja (Swenson et al. 2014).

- **Influencia de la variabilidad genética viral.** La mayoría de las infecciones en niños ocurren en países donde circulan más variantes diferentes del VIH-1, como en África subsahariana. Puesto que el diseño de las técnicas de diagnóstico y de CV se basa principalmente en el subtipo B, no todos los ensayos virológicos detectan con la misma eficacia el resto de las variantes del VIH-1, sobre todos recombinantes complejos (Holguín et al. 2008b; Mouinga-Ondémé et al. 2014; Margariti et al. 2016).

- **Influencia del tipo y volumen de muestra.** La sensibilidad del ensayo puede verse afectada también por el tipo y volumen de muestra empleada en la técnica molecular. La mayoría requieren 0,5-1 ml de plasma o suero y ello exige tomar, al menos, 1-3 ml de sangre en el paciente, lo que no es fácil en neonatos, niños con malnutrición o con bajo peso. Recientemente, en países en desarrollo se ha empezado a extender el uso de la sangre seca recogida en papel de filtro especial (DBS, *dried blood spots*) en lugar de sangre tomada por venopunción para el diagnóstico perinatal, siendo una alternativa práctica al plasma o suero en el diagnóstico de niños menores de 18 meses

(De Mulder & Holguín 2013). Sin embargo, el pequeño volumen de muestra tomada en el DBS disminuye la sensibilidad del ensayo de CV, calculado como copias de ARN de VIH-1 por ml (cp/ml) de plasma. Para poder comparar el límite de detección en DBS con el establecido en plasma por las casas comerciales correspondientes se requiere una validación de cada técnica molecular empleando muestras pareadas de plasma y DBS. Así se puede estimar el límite de detección de cada ensayo específico empleando sangre seca, teniendo en cuenta el hematocrito del paciente en la cuantificación final de su viremia.

- **Influencia del límite de detección de la técnica empleada.** Si la muestra presenta CV por debajo del límite de detección de la técnica molecular empleada, como puede ocurrir en niños que han tenido profilaxis en el periodo prenatal, podría dar lugar a falsos negativos en el diagnóstico molecular del VIH-1 en esos pacientes.

- **Influencia de la tasa de transmisión vertical del virus.** A medida que disminuye la tasa de la tasa de transmisión vertical, se reduce el valor predictivo positivo de una prueba de diagnóstico molecular del VIH-1 (Feucht et al. 2012), aumentando así el número de falsos positivos.

MUESTRAS DE SANGRE SECA (DBS, DRIED BLOOD SPOTS)

La OMS recomienda el uso de DBS (WHO 2010b; Bertagnolio et al. 2010; WHO 2012b) para la monitorización de la infección por VIH-1 en programas de salud pública en países de recursos limitados (De Mulder & Holguín 2013). Son útiles para el diagnóstico molecular precoz (Sherman et al. 2005; Creek et al. 2008; Lofgren et al. 2009; Dube et al. 2012; Yapo et al. 2013; Smit et al. 2014; Alvarez et al. 2016b) y el diagnóstico serológico del virus (Fernández McPhee et al. 2015), y para la monitorización del TAR al usarse para cuantificar la CV, detectar MDR y caracterizar molecularmente la variante viral (Cassol et al. 1999; Holguín et al. 2011; Neogi et al. 2012; De Mulder & Holguín 2013; Holguín et al. 2013b; Smit et al. 2014; Erba et al. 2015; Tchiakpe et al. 2016; Gueye et al. 2016; Mutagoma et al. 2016; Prieto-Tato et al. 2016; Salou et al. 2016; Templer et al. 2016). También se han usado DBS para detectar eventos de fracaso virológico cuando la CV es mayor a 5.000 cp/ml (Sawadogo et al. 2014). Para tomar la muestra se realiza un pequeño pinchazo en el talón (neonatos) o dedo (niños más mayores) con una lanceta estéril, recogiendo unas pocas gotas de sangre del paciente en una tarjeta de papel de filtro especial (WHO 2010b). Así se evita la venopunción, siendo una técnica de toma de muestra más segura, barata y con almacenamiento y transporte más sencillo que el de plasma o

sangre completa (Brambilla et al. 2003; Leelawiwat et al. 2009; Johannessen 2010; Johannessen et al. 2010; De Mulder & Holguín 2013; Aitken et al. 2015). Los DBS, una vez secos, se pueden almacenar a temperatura ambiente durante periodos cortos, mandarlos a laboratorios de referencia o bien almacenarlos en el congelador a -20°C/-80°C hasta su uso para el diagnóstico molecular. Cuanto mejor se tome el DBS y a menor temperatura se preserve, mayor será la integridad de los ácidos nucleicos para su posterior detección por técnicas virológicas (Aitken et al. 2015).

Algunas técnicas moleculares comerciales ya están validadas para el diagnóstico del VIH-1 y la cuantificación de la CV empleando menos de 0,05-0,1 ml de sangre seca tomada en el DBS, que corresponden aproximadamente a 1 o 2 gotas de sangre recogidas en uno de los círculos del papel. Normalmente, se pueden realizar pruebas moleculares a partir de 2-4 gotas de sangre de niños o adultos infectados. Cuando se usan DBS vs. suero o plasma para el diagnóstico serológico del VIH-1 por un ELISA se deberían ajustar los puntos de corte, como se ha observado para otras infecciones (Holguín et al. 2013a).

GENERALIDADES DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

En los últimos diez años ha aumentado el número de personas recibiendo TAR, consiguiendo que 17 de los 37 millones de personas infectadas por el VIH estuviesen en tratamiento (UNAIDS 2016b), aunque se espera que en el 2020 el 90% de infectados reciban TAR (WHO 2016b; UNAIDS 2016d). En 2015, el 93% de los 1,5 millones de mujeres embarazadas infectadas por VIH-1 recibieron TAR para prevenir la transmisión materno-infantil (UNAIDS 2016c). Sin embargo, 1,8 de los 3 millones de niños infectados no tenían acceso al TAR tras su nacimiento (UNAIDS 2016c).

En el ciclo infectivo del VIH existen varios pasos clave que han sido elegidos para el diseño de fármacos antirretrovirales que bloqueen la replicación del virus. Dos de las enzimas fundamentales del ciclo, la TI y la PR (pasos 3 y 7, **Figura I.2**), son dianas moleculares para las primeras familias de fármacos ARV: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos (ITIAN) o no análogos de nucleós(t)idos (ITINAN) e inhibidores de la proteasa (IP). La triple combinación de 2 ITIAN más un tercer fármaco (1 ITINAN o 1 IP) es la base de la actual terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA). A estas familias les han seguido los inhibidores de la entrada, que actúan sobre el receptor o sobre el correceptor (paso 1, **Figura I.2**) y los inhibidores de la integrasa (paso 4, **Figura I.2**). Estas nuevas familias se utilizan como tercer fármaco

alternativo. Con ello, se dispone de un total de 6 familias de fármacos aprobadas en España (GeSIDA 2016), lo que supone un gran arsenal terapéutico de ARV.

Ya que hasta el momento es imposible la erradicación del VIH, el objetivo del TARGA es suprimir al máximo la replicación del virus. Debido a la estructura en cuasiespecie del virus y a la imposibilidad de la supresión completa de su replicación, tras el inicio del tratamiento el VIH puede seleccionar rápidamente variantes preexistentes portadoras de mutaciones que le confieran una reducción de susceptibilidad o incluso resistencia a los fármacos y fracaso del TAR (Kuritzkes et al. 2008). Se han descrito MDR para todos los ARV en uso que reducen la actividad farmacológica del antirretroviral mediante distintos mecanismos, aunque no todas las mutaciones tienen la misma importancia. Para cada fármaco existen MDR “primarias o principales”, que determinan resistencia farmacológica y suelen disminuir la capacidad replicativa (*fitness*) del virus. También pueden existir MDR secundarias en ciertas familias de fármacos, que contribuyen a la resistencia en menor medida, estando alguna de ellas presentes de manera natural en ciertas variantes del VIH-1 (SEIP-PNS 2016). Se han identificado las mutaciones más relevantes asociadas a resistencia para pacientes no expuestos (*naïve*) (Bennett et al. 2009), conocidas como mutaciones de resistencia transmitidas (MRT) (**Anexo II**), mientras que para aquellos pacientes en tratamiento se consideran mutaciones de resistencias adquiridas (MRA) (Wensing et al. 2015) (**Anexo II**). Las MDR pueden quedar archivadas por meses o años en el ADN proviral en el genoma de la célula hospedadora y emerger después al ser seleccionadas por el TAR (Persaud et al. 2007). Actualmente la monitorización de resistencias a nivel mundial es un tema prioritario para la OMS (WHO 2016b).

La replicación se monitoriza mediante la determinación periódica de la CV en plasma sanguíneo, que se intenta mantener por debajo de 50 cp/ml ($1,7 \log_{10}$), límite de detección de la mayoría de las técnicas. Las más modernas detectan hasta 20 cp/ml, límite en el que se asume que no se seleccionan mutaciones de resistencia (Nettles et al. 2004). Por ello, la OMS recomienda la cuantificación de la viremia para reforzar la adherencia al TAR antes de la selección de resistencias en la población viral (Wilson et al. 2009; Bonner et al. 2013; WHO 2015). Sin embargo, la capacidad para implementar un test de CV de rutina es limitada en muchas zonas por el coste de las técnicas, falta de infraestructuras y dificultades en la toma, almacenamiento y transporte de muestras para cuantificar el virus (Keiser et al. 2011; Roberts et al. 2012; Bonner et al. 2014; Lecher et al. 2015). Ya que durante la infección por el VIH se pierden progresivamente los linfocitos T CD4 en sangre periférica y tejidos linfoides

(Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 1998), el otro parámetro utilizado para el seguimiento de la infección es el número de linfocitos T CD4 en sangre, que aumenta con el TAR (Powderly et al. 1998).

TRANSMISIÓN VERTICAL Y PROGRAMAS PTMH EN GUINEA ECUATORIAL

Durante los últimos años se han ampliado el número de programas de prevención de la transmisión del VIH de madre a hijo (PTMH) a nivel mundial y se han recomendado visitas de asesoramiento clínico a niños expuestos desde las primeras semanas de vida hasta los 18 meses de edad (UNAIDS 2015). Sin embargo, en África subsahariana, donde se concentra la mayor incidencia de la infección por VIH en adultos y niños, existen importantes barreras para el desarrollo de programas PTMH (De Cock et al. 2000; Aizire et al. 2013). Estas barreras están relacionadas fundamentalmente con factores socio-económicos, con una escasa información para la prevención de la infección en la mujer en edad fértil, con la falta y dificultad de acceso a una estructura sanitaria adecuada para su diagnóstico y tratamiento, con el estigma asociado a la infección y con una falta de programas de apoyo social o económico (Wettstein et al. 2012). A pesar de ello, en los últimos años se ha extendido el TAR en estos países y en el colectivo de mujeres embarazadas (UNAIDS 2016b).

En Guinea Ecuatorial, país cercano al epicentro de la pandemia y localizado en la costa oeste de África, entre Camerún y Gabón, el VIH/sida es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en la población. En Guinea Ecuatorial circulan múltiples cepas distintas del VIH-1, principalmente variantes no-B del VIH-1 (93%), siendo el recombinante CRF02_AG prevalente (Yebra et al. 2013a; Alvarez et al. 2016a), como ocurre en otros países de África Occidental (Ortiz et al. 2001; Brennan et al. 2008; Hemelaar et al. 2011). El mayor número de infecciones ocurre por vía heterosexual, seguida por la transmisión vertical y las transfusiones. La prevalencia del VIH en la población de 15-49 años se ha duplicado desde 2004 (3,2%) al 2011 (6,2%), siendo significativamente superior en mujeres (8,3%) que en hombres (3,7%) (UNAIDS 2014). La prevalencia en mujeres embarazadas en el país ha crecido del 1,5% en 1997 al 7,3% en 2008 (UNAIDS 2014). En 2013, el 93,5% de las mujeres embarazadas infectadas por VIH recibió PTMH, habiendo aumentado notablemente desde el año anterior (30,2%) (UNAIDS 2014). En 2013, el país contaba con 61 estructuras que dispensaban atención prenatal. Entre ellas, 37 realizaban el test y 18 prestaban el servicio completo de PTMH. En este mismo periodo ha aumentado

progresivamente el número de mujeres embarazadas que realizaron el test de VIH, siendo 199 en el año 2000, 4.698 en 2008 y 10.384 en 2013 (UNAIDS 2014).

La transmisión vertical del VIH puede ocurrir durante la gestación, el parto o la lactancia (Kourtis et al. 2006). La infección intraútero está mediada por microtransfusiones sanguíneas de la madre al feto a través de la placenta. Estas microtransfusiones se vuelven más frecuentes por las contracciones intrauterinas en el momento del parto, aumentando así las probabilidades de la transmisión del virus. Además, a través del canal del parto, el feto tiene contacto mucocutáneo con la sangre materna, el líquido amniótico y las secreciones cervicovaginales. En ausencia de intervenciones específicas, la tasa estimada de transmisión vertical es del 15-40% (Kourtis et al. 2006). En general, el riesgo de transmisión es mayor en las gestantes con estadios clínicos e inmunológicos de enfermedad avanzada y en aquellas con CV elevada (Mofenson & McIntyre 2000; Thorne & Newell 2005). De hecho, la CV materna se considera como uno de los principales factores de riesgo de la transmisión vertical (European Collaborative Study 1999; Garcia et al. 1999; Mofenson & McIntyre 2000). Por lo tanto, uno de los objetivos principales de los programas PTMH es reducir la CV mediante el TAR durante la gestación para reducir la transmisión del VIH (European Collaborative Study 1999).

El Centro Nacional de Medicina Tropical del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España), a través del Programa de Cooperación Bilateral, ha colaborado en los últimos años con el Programa Nacional de Lucha Contra el Sida y al Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial ofreciendo un apoyo técnico en el desarrollo de un programa PTMH. Dentro de esta ayuda se encuentra formación al personal clínico para mejorar e implantar el PTMH. En ello han participado pediatras de los Hospitales Universitarios 12 de Octubre y de Getafe, en Madrid. En 2008 se actualizó el protocolo nacional de PTMH de VIH (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009), recomendando el cribado de la infección por el virus en toda mujer embarazada. En caso de resultar positivo, se valoraba la indicación de TARGA o profilaxis siguiendo las recomendaciones de la OMS (WHO 2016a). En la primera evaluación del programa PTMH llevado a cabo en Guinea Ecuatorial, se incluyeron 103 pares de madres e hijos nacidos entre 2008-2011, observándose un bajo cumplimiento del programa y un alto porcentaje de niños con pérdida de seguimiento antes de la confirmación del diagnóstico (Badillo-Navarro et al. 2014).

Según el protocolo nacional de Guinea Ecuatorial, el diagnóstico de VIH se realizaba en un acto único con 3 test rápidos: Determine (Abbott Laboratories,

EE.UU.), Unigold (Michigan Regional Laboratory System), Hexagon (Acon Laboratories, San Diego, California, EE.UU.) (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). Antes de realizar la prueba, las madres recibían educación sanitaria sobre la infección por VIH y debían dar su consentimiento informado por escrito para realizar el diagnóstico. Cuando el resultado de los 3 ensayos era positivo, se consideraba confirmada la infección por VIH y la madre recibía educación sanitaria, seguimiento clínico y apoyo psicosocial. Tras la valoración clínica e inmunológica se indicaba TARGA o profilaxis con ARV según las recomendaciones de PTMH del Plan Nacional de Lucha contra el VIH/sida de Guinea. Según este protocolo, las gestantes con estadios clínicos 3 y 4 de la OMS o con recuentos de CD4 <350 células/mm³ tenían indicación de inicio de TARGA, mientras que las gestantes con estadios clínicos 1 o 2 de la OMS o CD4 >350 células/mm³ tenían indicación de profilaxis. Según el Protocolo Nacional, la profilaxis en la madre incluía la administración de zidovudina (AZT) desde la semana 28 de gestación, la toma de AZT, lamivudina (3TC) y nevirapina (NVP) en el momento del parto, seguido de AZT y 3TC durante una semana en el posparto para evitar la selección de resistencias a NVP en dosis única. El TAR de primera línea recomendado para las madres infectadas por VIH incluía AZT, 3TC y NVP. El protocolo recomienda que, tras el nacimiento, el niño reciba una dosis única de NVP y profilaxis con AZT de 1 a 4 semanas, según el tiempo total de TAR que recibiese la madre durante la gestación.

La OMS recomienda encuestas poblacionales para detectar si la prevalencia de resistencias en pacientes *naïve* y tratados está alcanzando niveles alarmantes (Bennett et al. 2008; WHO 2016b). Aunque en 2005 comenzó el suministro de TAR de forma regular en Guinea Ecuatorial, los tratamientos esporádicos, la exposición interrumpida a fármacos y las altas tasas de pérdida de seguimiento podrían causar la aparición de MDR. Por ello y para una mayor eficacia del tratamiento en programas PTMH, es crucial documentar el perfil de MDR en virus que infectan a mujeres embarazadas para mejorar su tratamiento y la profilaxis de los hijos. Los datos actualizados de resistencia pueden ayudar a los clínicos a establecer el TAR de primera línea para pacientes *naïve* o a optimizar la segunda línea de tratamiento en pacientes pretratados en fracaso virológico. Sin embargo, a pesar del aumento de la prevalencia, de la expansión del acceso al TAR y de la localización cercana al epicentro de la pandemia, Guinea Ecuatorial carece actualmente de estudios sistemáticos de vigilancia para monitorizar la resistencia a ARV y detectar cambios en la epidemiología molecular del VIH-1 y la OMS no contempla realizar estos estudios en el país en los próximos 5 años (WHO 2016b).

OBJETIVOS |

Los objetivos de esta Tesis fueron:

1. Comparar la cuantificación de la carga viral del VIH-1 en muestras pareadas de sangre seca (DBS) y plasma infectadas utilizando la técnica VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR) de Siemens.
2. Evaluar la eficacia de cuatro técnicas virológicas comerciales usando dos gotas de sangre seca para realizar el diagnóstico precoz de VIH-1 en niños expuestos al virus nacidos de madres infectadas de Guinea Ecuatorial.
3. Comparar el rendimiento de dos técnicas comerciales de cuantificación de la carga viral del VIH-1 usando muestras de sangre seca de pacientes infectados por distintas variantes del virus con el fin de analizar la influencia de la variabilidad genética viral en la cuantificación de la viremia.
4. Describir las variantes circulantes del VIH-1 y las mutaciones de resistencia a antirretrovirales en una población de mujeres embarazadas e infectadas por el VIH-1 de Bata, Guinea Ecuatorial.

CAPÍTULO 1

Cuantificación del ARN viral a partir de muestras de sangre seca y plasma infectados por VIH-1 utilizando Siemens VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR)

ANTECEDENTES

Cómo se ha comentado en la **Introducción**, es esencial cuantificar la CV del VIH-1 para la monitorización de la eficacia del TAR, la detección de fracaso terapéutico y el diagnóstico precoz de la infección por VIH en niños durante las primeras semanas de vida (Rouet et al. 2008; Viljoen et al. 2010). El test de CV VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR; Siemens Healthcare Diagnostics Inc., NY, EE.UU.) detecta la región de la IN viral (Troppan et al. 2009) y cuantifica el ARN viral mediante qPCR empleando plasma, o ARN viral y ADN proviral si se emplea sangre. Este ensayo presenta un límite de detección de 37 cp/ml ($1,57 \log_{10}$) en plasma y de 866 cp/ml en DBS (Kleshik et al. 2013). Sin embargo, el efecto de la variante del VIH-1 en la cuantificación de la CV mediante kPCR no ha sido evaluado extensamente, aunque kPCR ha cuantificado algunas variantes del VIH-1 en plasma (Ruelle et al. 2009; Troppan et al. 2009), y en DBS (Pirillo et al. 2011; Kleshik et al. 2013). Además, hay pocos estudios de CV que tengan en cuenta el hematocrito para corregir los valores de viremia del VIH-1 proporcionados por la técnica cuando la muestra de origen es sangre completa o sangre seca (Fiscus et al. 1998; Alvarez-Muñoz et al. 2005; Leelawiwat et al. 2009), y en ninguno de ellos se ha utilizado kPCR. En este primer capítulo se evalúa la concordancia entre la cuantificación de la CV mediante kPCR utilizando muestras pareadas de plasma y DBS en pacientes infectados por distintas variantes del VIH-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Los pacientes fueron reclutados en el Centro Sanitario Sandoval, clínica de referencia en VIH/sida y de infecciones de transmisión sexual (ITS), de Madrid tras firmar un consentimiento informado. En el estudio se incluyeron 62 pacientes *naïve* con diagnóstico serológico positivo de VIH-1 mayores de 18 años que acudieron a la consulta desde mayo de 2011 hasta marzo de 2012. Al ser todos *naïve* para TAR se esperaban altas cargas virales. Los pacientes procedían de 14 países distintos, principalmente de España (58,1%) y de América Latina (33,9%). En 56 de ellos se pudo recuperar la secuencia *pol* del VIH-1 para caracterizar subtipos y recombinantes virales. Once (19,6%) de ellos estaban infectados por variantes no-B del VIH-1 y procedían de España (n=5), América Latina (n=5) y Angola (n=1). El diagnóstico se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro Sanitario Sandoval. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

Toma de muestra

Se recogió sangre venosa mediante venopunción en tubos de 10 ml con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los DBS se prepararon añadiendo 70 µl de sangre en cada uno de los círculos de la tarjeta Whatman no.903 (Schleicher & Schuell, NH, EE.UU.) con un diámetro de aproximadamente 13 mm por círculo. El resto de la sangre se centrifugó para separar el plasma. Los DBS se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente y después se guardaron en bolsas de plástico individuales con cierre hermético, incluyendo dos bolsas de gel de sílice desecante. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta que fueron analizadas. La sangre restante se centrifugó a 2.800 rpm durante 15 m para recuperar el plasma, que se almacenó a -80°C hasta la cuantificación de la CV.

Cuantificación de la carga viral del VIH-1

La sangre seca infectada tomada en un círculo del DBS se eluyó en 2 ml de buffer de lisis específico para DBS que contenía tiocianato de guanidina (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EE.UU.; no disponible para su venta). El DBS se incubó en dicho buffer a temperatura ambiente durante 30 minutos en el agitador Intelli-Mixer RM-2 (Elmi Ltd., Riga, Letonia) con una agitación suave. A continuación, se procesaron 1,1 ml del sobrenadante del DBS y 1,5 ml de plasma con el módulo de preparación de muestra del sistema VERSANT kPCR. Para procesar los dos tipos de muestra se utilizaron los mismos parámetros predeterminados del software. En cada experimento se incluyeron dos réplicas del Calibrador A y del Calibrador B y una del control alto, del control bajo y del control negativo, tal y como se indica en las recomendaciones del fabricante. Los resultados proporcionados por el software pueden ser los siguientes: “no detectado” cuando hay detección de ARN viral pero está por debajo del límite de detección (<37 cp/ml), “inválido” si la muestra no se ha podido procesar correctamente por el módulo y un “valor de viremia >37 cp/ml” en muestras cuantificadas.

Los valores de viremia obtenidos para las muestras de DBS fueron corregidos teniendo en cuenta las diferencias con el volumen de plasma empleado, considerando el hematocrito de cada paciente. El hematocrito se obtuvo en el Centro Sanitario Sandoval utilizando el analizador hematológico automático SYSMEX XT-1800i. La sangre seca contiene ambas fracciones, la celular y la plasmática, siendo el hematocrito la proporción del volumen total de sangre compuesta por glóbulos rojos. Así, el porcentaje de volumen de plasma en 70 µl de sangre seca se pudo calcular restando a 100 el valor del hematocrito. Por lo tanto, para comparar los volúmenes de

sangre y DBS, el valor de cp/ml proporcionado por kPCR usando un círculo del DBS debería expresarse en copias por ml de plasma en los 70 µl de sangre seca empleados en la cuantificación. Por ello, para calcular la CV en el DBS de cada paciente infectado aplicando las correcciones del volumen de plasma presente en el círculo del DBS y del hematocrito en la sangre, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{cp/ml de plasma en DBS} = \frac{(\text{valor en cp/ml proporcionado por kPCR}) * 1000}{[70 - (70 * \text{hematocrito} / 100)]}$$

Amplificación, secuenciación de genes del VIH-1 y subtipaje

A partir de 62 muestras de plasma infectadas por VIH-1 se llevó a cabo la extracción de ARN viral (QIAamp viral RNA mini extraction kit, Qiagen, Hilden, Alemania) y su amplificación por una RT-PCR seguida de PCR anidada (nested) de la región codificante de *pol* del VIH-1 que incluía la PR completa (297 pb, codones 1-99) y parte de la TI (1.005 pb, codones 1-335). Las condiciones de amplificación por RT-PCR empleando el Kit One-Step RT-PCR (Qiagen) fueron: incubación a 50°C durante 30 m y a 95°C durante 15 m, 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 53°C durante 30 s y 72°C durante 1 m, con una extensión final a 72°C, 10 m. Las condiciones de amplificación por PCR nested usando el kit Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Fermentas) fueron: incubación a 98°C durante 30 s, 35 ciclos a 98°C durante 10 s, 53°C durante 30 s y 72°C durante 45 s, con una extensión final a 72°C, 10 m. Las secuencias virales se obtuvieron por secuenciación directa de los amplicones purificados por un servicio externo (Macrogen, Corea del Sur). Se recuperaron para el estudio 56 secuencias PR+TI parcial. Los cebadores empleados en la amplificación por RT-PCR y por PCR nested, así como para la secuenciación de las 56 muestras de plasma empleadas en este estudio se muestran en la **Tabla 1.1**.

Para identificar la variante viral (subtipo o recombinante) en las 56 secuencias virales *pol* obtenidas, se realizó un análisis filogenético, confirmando las variantes con varias webs de subtipaje rápido: Stanford HIVdb 6.0.5 Stanford University, CA, EE.UU.), Geno2Pheno (Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Alemania) y Comet (Centre de Recherche Public de la Sante, Luxemburgo) (**Anexo I**).

Análisis estadístico

Antes de realizar el análisis estadístico, los resultados de CV se convirtieron a \log_{10} . A las muestras que fueron detectadas con un valor de viremia por debajo del límite de detección de la técnica (<37 cp/ml) se les asignó el valor de 37 cp/ml (1,57 \log_{10}). La correlación entre plasma y DBS se determinó mediante el coeficiente de correlación

intraclase (CCI). El análisis Bland-Altman se utilizó para medir la concordancia entre ensayos (Bland & Altman 1986). Los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 13 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

Tabla 1.1. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR.

Cebador	Posición ^a	Secuencia (5'-3')
Ida		
OPR1	2057-2085	TGAARGAITGYACTGARAGRCAGGCTAAT
OPR3	2135-2159	YTCAGRCAGRCCRGARCCAACAGC
ORT1	2777-2803	TTYAGRGARCTYAATAARAGAACTCA
ORT3	2808-2833	TTYTGGGARGTYCARYTAGGRATACC
Vuelta		
OPR2	2995-2979	AYCTIATYCCTGGTGTGTYTCATTRTT
OPR4	2945-2950	CTGGTGTGTYTCATTRTTKRTACTAGGT
ORT2	3599-3623	CCTCITYTTGCATAYTTYCCTGTT
ORT4	3558-3593	GGYTCTTGRTAAATTTGRTATGTCCA

^aPosición en el genoma VIH-1 de acuerdo con la secuencia de referencia HXB2 (número de acceso K03455).

RESULTADOS

Tasa de detección del VIH-1 por KPCR en plasma y DBS

Las características epidemiológicas y datos de CV en plasma y DBS de los 62 pacientes incluidos en el estudio se muestran en la **Tabla 1.2**. El porcentaje de hematocrito en la sangre de dichos pacientes de estudio fue del 36,5-52,5%. Por lo tanto, el volumen resultante de plasma presente en 70 µl de sangre osciló entre 33,2 µl y 44,4 µl, variando según el paciente. La CV del VIH-1 en los DBS fue de 37-7.380 cp/ml, correspondiendo a 894-187.595 cp/ml tras la corrección por hematocrito y volumen de plasma.

El ARN viral fue detectado en 59 (95.2%) de las 62 muestras de plasma (rango 37-1.1*10⁶ cp/ml) de adultos infectados, estando por debajo del límite de detección (<37cp/ml) en los 3 plasmas restantes. En cuanto a los DBS, se detectó el ARN del VIH-1 en 52 de las 62 muestras, logrando una tasa de detección menor (83,9%). El máximo nivel de viremia en DBS fue detectado en el paciente con la CV más alta en plasma. El valor de CV corregido más bajo obtenido en DBS (894 cp/ml) se acercó al límite de detección de 866 cp/ml descrito en estudios anteriores (Kleshik et al. 2013). En 3 muestras de sangre seca (4,8%) el proceso de detección resultó inválido, mientras que en 7 (11,3%) no se detectó el ARN viral.

Tabla 1.2. Características epidemiológicas y datos de CV de los 62 pacientes incluidos en el estudio.

ID	Edad (años)	Sexo	Año de infección	País de origen	Variante VIH-1	CV plasma (cp/ml)	CV plasma (log ₁₀)	CV DBS (cp/ml)	CV DBS (log ₁₀)	Diferencia plasma - DBS
SAN2	34	M	2008	España	F/B	22.999	4,4	2.639	3,42	0,94
SAN3	42	M	2008	Bolivia	B	9.355	4,0	894	2,95	1,02
SAN4	32	M	2008	España	B	29.680	4,5	961	2,98	1,49
SAN5	36	M	2009	Venezuela	B	1.031	3,0	ND	ND	ND
SAN6	25	M	2009	España	C	89.280	5,0	7.523	3,88	1,07
SAN34	37	M	2010	España	B	54.300	4,7	9.777	3,99	0,74
SAN35	44	F	2006	EEUU	B	57.600	4,8	9.623	3,98	0,78
SAN37	26	M	2011	España	B	59.400	4,8	3.096	3,49	1,28
SAN38	34	M	2011	España	B	8.830	3,9	1.209	3,08	0,86
SAN40	31	M	2010	España	B	64.800	4,8	11.444	4,06	0,75
SAN41	39	M	2011	España	B	625.000	5,8	87.877	4,94	0,85
SAN42	26	M	2011	España	B	30.500	4,5	5.204	3,72	0,77
SAN50	30	M	2006	España	B	3.300	3,5	1.036	3,02	0,50
SAN51	45	M	2010	Colombia	NA	37	1,6	ND	ND	ND
SAN52	32	M	2007	Brasil	G	268	2,4	921	2,96	-0,54
SAN53	45	M	2009	España	B	3.780	3,6	927	2,97	0,61
SAN54	30	M	2011	Filipinas	B	25.400	4,4	1.314	3,12	1,29
SAN55	50	M	2010	España	B	52.000	4,7	6.689	3,83	0,89
SAN57	44	M	2007	España	CRF02_AG	40	1,6	941	2,97	-1,37
SAN58	30	M	2010	Panamá	B	10.700	4,0	994	3,00	1,03
SAN59	47	M	Desconocido	España	B	40.200	4,6	5.458	3,74	0,87
SAN61	42	M	2011	Europa Occidental	NA	2.430	3,4	982	2,99	0,39
SAN62	38	M	2009	Colombia	B	47.200	4,7	3.931	3,59	1,08
SAN63	34	M	2010	Colombia	B	87.900	4,9	13.765	4,14	0,81

ID	Edad (años)	Sexo	Año de infección	País de origen	Variante VIH-1	CV plasma (cp/ml)	CV plasma (log ₁₀)	CV DBS (cp/ml)	CV DBS (log ₁₀)	Diferencia plasma - DBS
SAN64	25	M	2010	España	B	42.800	4,6	1.902	3,28	1,35
SAN65	34	M	2010	España	B	124.000	5,1	8.085	3,91	1,19
SAN66	37	M	2010	España	G/B	25.600	4,4	1.032	3,01	1,39
SAN67	37	M	2009	Argentina	CRF02_AG/G	793	2,9	896	2,95	-0,05
SAN68	37	M	2009	Argentina	D/B	79.100	4,9	11.793	4,07	0,83
SAN69	41	M	2008	Latinoamérica	B	87	1,9	961	2,98	-1,04
SAN70	44	M	2011	España	NA	64.467	4,8	3.838	3,58	1,23
SAN71	43	M	2011	España	B	3.597	3,6	INV	INV	INV
SAN73	35	M	2007	España	B	3.119	3,5	913	2,96	0,53
SAN74	26	M	2010	Brasil	B	20.375	4,3	1.982	3,30	1,01
SAN75	33	M	2008	Chile	F/B	3.644	3,6	1.003	3,00	0,56
SAN80	40	M	2011	Latinoamérica	F1	1.162.897	6,1	187.595	5,27	0,79
SAN85	32	M	2011	Brasil	B	4.425	3,6	946	2,98	0,67
SAN86	40	M	2008	España	B	2.439	3,4	942	2,97	0,41
SAN87	Desconocido	F	Desconocido	Latinoamérica	B	13.553	4,1	1.630	3,21	0,92
SAN88	26	M	2011	Latinoamérica	B	56.275	4,8	5.081	3,71	1,04
SAN89	25	M	2008	España	B	123.130	5,1	6.470	3,81	1,28
SAN90	52	M	2005	Angola	C	<37	<1,57	ND	ND	ND
SAN91	47	M	2006	Latinoamérica	B	6.651	3,8	3.954	3,60	0,23
SAN92	29	M	2011	Europa Occidental	B	124.734	5,1	25.269	4,40	0,69
SAN93	47	M	2011	España	NA	9.999	4,0	INV	INV	INV
SAN94	46	M	2011	España	B	4.971	3,7	970	2,99	0,71
SAN95	29	M	2009	Latinoamérica	B	7.616	3,9	1.190	3,08	0,81
SAN96	36	M	2007	Latinoamérica	B	343.700	5,5	59.545	4,77	0,76
SAN97	36	M	2010	Ecuador	B	351	2,5	1.102	3,04	-0,50
SAN99	39	M	2005	España	B	4.540	3,7	1.195	3,08	0,58
SAN103	47	M	2000	España	B	4.200	3,6	10.946	4,04	-0,42

ID	Edad (años)	Sexo	Año de infección	País de origen	Variante VIH-1	CV plasma (cp/ml)	CV plasma (log ₁₀)	CV DBS (cp/ml)	CV DBS (log ₁₀)	Diferencia plasma - DBS
SAN105	30	M	2010	España	B	128	2,1	ND	ND	ND
SAN106	30	M	2011	España	B	2.830	3,5	INV	INV	INV
SAN109	31	M	2006	España	B	18.130	4,3	1.097	3,04	1,22
SAN111	35	M	2010	España	B	9.918	4,0	ND	ND	ND
SAN112	38	M	2010	España	G/B	42.340	4,6	9.714	3,99	0,64
SAN113	36	M	2010	España	B	3.324	3,5	913	2,96	0,56
SAN114	34	M	2008	España	B	25.470	4,4	1.426	3,15	1,25
SAN115	34	M	2011	España	B	21.000	4,3	2.843	3,45	0,87
SAN116	46	M	2009	España	NA	367	2,6	ND	ND	ND
SAN117	40	M	2010	España	B	100.200	5,0	17.043	4,23	0,77
SAN118	35	M	2005	Latinoamérica	NA	37	1,6	ND	ND	ND

ID, identificación; CV, carga viral; cp/ml, copias/mililitro; log₁₀, logaritmo₁₀; DBS, *dried blood spots*; F, femenino; M, masculino; NA, no amplificado; ND, no detectado; INV, inválido. Las muestras con sobreestimación de la CV en DBS aparecen sombreadas en gris.

Correlación y concordancia de la carga viral del VIH-1 en plasma y DBS

Como expusimos previamente, en 52 (83,9%) de los 62 pacientes la viremia fue detectable y cuantificable por kPCR en plasma y DBS, por lo que pudimos analizar la concordancia entre los valores de CV en ambos tipos de muestras mediante el método Bland-Altman (Bland & Altman 1986) (**Figura 1.1**). Todas las muestras (92,3%) excepto 4, se encontraron dentro de los límites de concordancia de $\pm 1,96$ desviaciones estándar, mostrando así una buena concordancia entre la cuantificación de los dos tipos de muestra. El CCI fue un 82,3% [intervalo de confianza (IC) del 95%: 69,1-89,8].

A pesar de que los 62 pacientes eran *naïve*, 24 (38,7%) presentaron valores de CV inferiores a 5.000 cp/ml, 10 (16,1%) muestras estaban por debajo de 1.000 cp/ml y 3 (4,8%) se encontraban por debajo del límite de 37 cp/ml en plasma. Al comparar la cuantificación de la CV entre muestras pareadas de plasma y sangre seca, encontramos una subestimación media de 0,8 log₁₀ en DBS. Sin embargo, la detección del ARN viral fue mayor en DBS en aquellas muestras con CV en plasma superior a 1.000 cp/ml.

Considerando las 10 muestras con una CV en plasma menor de 1.000 cp/ml (rango: 37-793 cp/ml), en cinco de ellas con CV en plasma entre 37 y 367 cp/ml no se detectó el ARN viral utilizando DBS (1 subtipo B, 1 subtipo C y 3 muestras con subtipo desconocido). Sin embargo, los valores de viremia obtenidos en DBS fueron sobreestimados por kPCR en las 5 muestras restantes con baja CV en plasma (rango 40-793 cp/ml usando plasma y 896-1.102 cp/ml en DBS). Solo 1 (1,9%) de las 52 muestras con CV alta en plasma (4.200 cp/ml) mostró una sobreestimación en DBS (10.946 cp/ml). En resumen, se observó una sobreestimación de la CV en DBS en 6 muestras, 5 de ellas con baja carga viral plasmática y 1 con CV en plasma alta (**Tabla 1.2**). La sensibilidad del test y la concordancia con los valores de CV en plasma se evaluaron utilizando dos umbrales: 37 cp/ml (el límite de detección de kPCR) y 1.000 cp/ml, usado para definir fracaso terapéutico en países de recursos limitados según la OMS (**Tabla 1.3**) (WHO 2013). La sensibilidad de kPCR usando DBS fue del 92,9% (95% IC: 82,7-98%) y del 75,5% (95% IC: 61,1-86,6%) usando los límites de 37 y 1.000 cp/ml respectivamente. Desgraciadamente, el número de muestras con CV indetectable en plasma fue demasiado bajo como para poder analizar la especificidad y establecer alguna conclusión acerca de resultados falsos positivos potenciales usando DBS.

Figura 1.1. Análisis de concordancia entre plasma y DBS mediante el método Bland-Altman. Las líneas horizontales representan la media de la diferencia y las desviaciones estándar (DE) $\pm 1,96$.

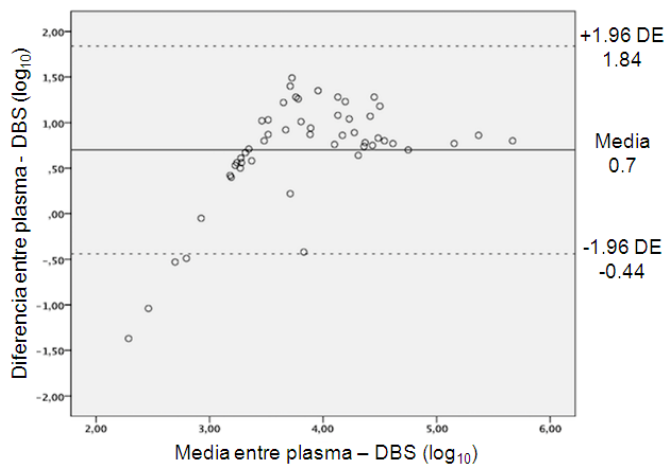


Tabla 1.3. Concordancia en la detección del ARN viral entre plasma y DBS según dos umbrales de detección.

DBS	Plasma			
	CV (cp/ml)	≥ 37	< 37	total
	≥ 37	52	0	52
	< 37	4	3	7
	total	56	3	59
	CV (cp/ml)	≥ 1.000	< 1.000	total
	≥ 1,000	37	1	38
	< 1,000	12	9	21
	total	49	10	59

Viremia de 37 cp/ml, límite de detección de kPCR en muestras de plasma (Tropan et al. 2009). Viremia de 1.000 cp/ml, umbral de CV para fracaso terapéutico según las guías de la OMS (WHO 2013).

Influencia del subtipo en la cuantificación de la carga viral del VIH-1

La variante del VIH-1 sólo se pudo conocer en 56 (90.3%) de las 62 muestras, ya que las 8 muestras restantes no se pudieron amplificar para su secuenciación y posterior análisis filogenético. Los valores de CV por kPCR revelaron diferentes variantes con viremia plasmática baja, aunque las muestras se tomaron de pacientes que nunca habían recibido antirretrovirales para controlar la infección por VIH-1: <37 cp/ml (1 subtipo C), 37-1.000 cp/ml (3 subtipo B, 2 CRF02_AG, 1 subtipo C, 1 subtipo G) y 1.000-5.000 cp/ml (15 subtipo B, 2 CRF02_AG, 1 subtipo C, 1 subtipo G y un recombinante F/B) (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Diferencia media entre los resultados obtenidos por kPCR usando muestras pareadas de plasma/DBS de 56 pacientes *naïve* con secuencia disponible según la variante del VIH-1.

Variantes VIH-1 (<i>pol</i>)	Muestras con subtipo	Detección de ARN viral por kPCR en plasma/DBS				CV (cp/ml)						Diferencia media en log ₁₀ (plasma vs. DBS corregido)
						En 1ml plasma		En 70µl de sangre seca				
								Sin corregir		Corregido		
		Detectados ^a		INV	ND	Media (rango)	Log ₁₀	Media (rango)	Log ₁₀	Media (rango)	Log ₁₀	
Todos	<37 cp/ml											
Recombinante FB	2	2/2	0/1	0/0	0/0	13.322 (3.644-22.999)	4,1	71 (<37-104)	1,85	1.821 (1.003-2.639)	3,3	0,9
Sub-subtipo F1	1	1/1	0/0	0/0	0/0	1.162.897	6,1	7.380	3,9	187.595	5,3	0,8
Recombinante BG	2	2/2	0/0	0/0	0/0	33.970 (25.600- 42.340)	4,5	206 (40-374)	2,3	5.373 (1.032-9.714)	3,7	0,8
Recombinante DB	1	1/1	0/0	0/0	0/0	79.100	4,9	473	2,7	11.793	4,1	0,8
Subtipo C	2	2/1	1/0	0/0	0/1	44.658 (<37-89.280)	4,65	297	2,5	7.523	3,9	0,75
Subtipo B	45	45/40	0/10	0/2	0/3	50.723 (87-625.000)	4,7	327 (<37-3.900)	2,5	10.722 (894-87.877)	4	0,7
Subtipo G	1	1/1	0/1	0/0	0/0	268	2,4	<37	<1,57	921	3	-0,6
Recombinante CRF02_AG	2	2/2	0/2	0/0	0/0	416 (40-793)	2,6	<37	<1,57	919 (896-941)	3	-0,4
Total subtipados	56	56/50	1/14	0/2	0/4	66.242 (37-1.162.897)	4,8	433 (37-7.380)	2,6	10.893 (941-187.595)	4	0,8
Total excluyendo G y CRF02_AG	53	53/47	1/11	0/2	0/4	61.079 (37-1.162.897)	4,8	583 (37-7.380)	2,8	11.158 (894-187.595)	4	0,8

Solo se pudo identificar la variante en 56 de los 62 pacientes. CV, carga viral; DBS, *dried blood spots*. ^aDetectado por kPCR en muestras con cuantificación válida en plasma y en 70 µl de sangre seca.

DISCUSIÓN

En este capítulo se compara la cuantificación de la CV del VIH-1 en muestras de plasma y de sangre seca una cohorte de 62 pacientes *naïve* diagnosticados en el Sanitario Sandoval de Madrid. La cuantificación de la CV es de gran utilidad para la detección de fracaso terapéutico en pacientes tratados. Al contrario que las muestras de plasma, que contienen solo ARN viral, las muestras de DBS contienen ADN proviral y ADN sin integrar. Puesto que se observó una sobreestimación de la CV en DBS principalmente en muestras con CV <1.000 cp/ml en plasma, nuestros resultados sugieren una mayor contribución del ADN viral en muestras que presentan una baja CV plasmática. Ya que la viremia no se controla sin TAR y los pacientes de este estudio eran *naïve*, teóricamente debería haber sido posible detectar el ARN viral en las muestras de plasma. Sin embargo, el 38,7% de las 62 muestras presentaron valores de CV inferiores a 5.000 cp/ml, el 16,1% muestras estaban por debajo de 1.000 cp/ml y el 4,8% se encontraban por debajo del límite de 37 cp/ml, sugiriendo una subestimación de la CV en ciertas muestras al usar este test, lo cual es relevante durante la monitorización del TAR y durante la detección de eventos de fracaso terapéutico.

Como se ha comentado en la **Introducción** de esta Tesis, la variabilidad genética puede afectar a la cuantificación de la CV, siendo aún un reto para medir la viremia (Gueudin et al. 2007; Holguín et al. 2008b; Mouinga-Ondémé et al. 2014). Se han observado discrepancias en la cuantificación de la misma muestra de ciertas variantes tras usar distintas técnicas, incluyendo el subtipo G y el CRF02_AG (Gueudin et al. 2007; Holguín et al. 2008b). Esto subraya la importancia de un diseño adecuado de los cebadores y sondas para realizar una cuantificación óptima del ARN del VIH-1 en todas las variantes, incluyendo los recombinantes que van creciendo en la pandemia (Lau & Wong 2013). Sin embargo, según los resultados, la CV fue una media de 0,8 log₁₀ más baja en DBS que en plasma, generando una sobreestimación en aquellos infectados por el subtipo G y el CRF02_AG. Por lo tanto, es importante tener en cuenta estas sub- y sobreestimaciones al usar tan solo dos gotas de sangre para cuantificar la CV mediante kPCR, sabiendo que la eficiencia de la detección puede variar dependiendo del subtipo o recombinante del VIH-1. Teniendo en cuenta estos resultados, se deberían estudiar paneles más amplios de muestras infectadas por un amplio número de variantes no-B diferentes, especialmente el subtipo G y el CRF02_AG, para identificar la diferencia en los valores de CV cuando se usan muestras de plasma y DBS y para identificar qué técnicas los cuantifican mejor.

En este trabajo se han encontrado algunas limitaciones a la hora de cuantificar la CV en muestras de sangre seca. Primero, el volumen de plasma (aproximadamente 35-40 μ l) recuperado de la sangre seca recogida (70 μ l) en el DBS es menor que el utilizado normalmente de plasma (0,5 ml). Esto dificulta la detección del ARN viral, subiendo el límite de detección del ensayo en muestras de DBS para cualquier técnica (866 vs. 37 cp/ml para kPCR), y complica la comparación de la CV con muestras de plasma. Además, son muy pocos los trabajos que comparan la CV en distintos tipos de muestras aplicando el factor de corrección del hematocrito (Fiscus et al. 1998; Alvarez-Muñoz et al. 2005; Leelawiwat et al. 2009). Algunas técnicas de cuantificación de la CV cuentan con protocolos específicos para DBS e incorporan un algoritmo en su software que corrige la diferencia entre plasma y DBS. Sin embargo, este algoritmo está protegido y no es posible saber cómo realiza la corrección. En este trabajo, se ha realizado la corrección porque kPCR no dispone de un programa para sangre seca. Por lo tanto, es importante conocer la técnica que se usa para cuantificar la viremia para no sub- o sobreestimar la CV.

En resumen, se ha confirmado que los DBS son una buena alternativa al plasma para la cuantificación de la CV, sobretodo en países de bajos recursos, aunque se ha encontrado una subestimación de 0,8 \log_{10} al utilizar dos gotas de sangre seca para la cuantificación de la CV usando kPCR. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el valor de CV puede estar sub- o sobreestimado según la variante que infecta al individuo, lo cual puede estar afectado por los niveles de ADN proviral que contiene el DBS.

El trabajo descrito en este capítulo fue publicado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Álvarez P, Rodríguez C, Martín L, del Romero J y Holguín A. *HIV-1 RNA quantification from Dried Blood Spots and plasma using the Siemens VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR)*. Journal of Virology and Antiviral Research. 2014;3(2). Factor de impacto: 0.8.

CAPÍTULO 2

Influencia de la variabilidad viral sobre la cuantificación de la carga viral del VIH-1 por técnicas comerciales usando DBS

ANTECEDENTES

Como se ha comentado previamente en la **Tesis**, la cuantificación de la CV del VIH-1 es útil para el diagnóstico precoz del VIH en recién nacidos (Alvarez et al. 2016b) y para monitorizar la eficacia del TAR al proporcionar un indicador temprano de fracaso terapéutico (Rouet et al. 2008; Bartlett & Shao 2009; Johannessen et al. 2010; Viljoen et al. 2010; Keiser et al. 2011). La OMS recomienda el uso de DBS frente al plasma para la cuantificación de la CV en lugares remotos o cuando hay poco volumen de muestra disponible, pero no está implantada en muchos países, como es el caso de Guinea Ecuatorial (WHO 2015). La variabilidad genética del virus puede afectar a la monitorización de la CV llevando a una sub- o sobreestimación de la CV o incluso a la no detección del ARN viral cuando se usan diferentes metodologías, variando entre técnicas (Von Truchsess et al. 2006; Holguín et al. 2008b; Luft et al. 2011; Rouet et al. 2011; Bruzzzone et al. 2014; Mouinga-Ondémé et al. 2014). Por ello, y antes de implantar una técnica de CV usando DBS en un país, se deberían comparar varias técnicas para ver cuál cuantifica mejor las variantes circulantes en el país. En este capítulo se evalúa, por primera vez, el rendimiento de dos ensayos comerciales de CV (Siemens y Roche) usando DBS recogidos de personas infectadas por VIH-1 en Guinea Ecuatorial participantes en un programa de PTMH, comparando los valores de CV en distintas variantes del VIH-1 circulantes en este país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y toma de muestra

Desde noviembre de 2012 hasta diciembre de 2013 se recogieron un total de 176 DBS (incluyendo 30 muestras longitudinales) de 146 pacientes que se incluyeron en este estudio (**Tabla 2.1**). De ellos, 69 eran mujeres (65 infectadas por VIH, 4 no infectadas) y 77 sus hijos/as menores de 18 meses (2 infectados por VIH, 75 no infectadas). Todos ellos participaban de un programa PTMH llevado a cabo en el Hospital Regional de Bata, Guinea Ecuatorial. Por lo tanto, un total de 71 DBS VIH-positivos (de 65 madres y 2 niños) y 105 DBS VIH-negativos (de 4 madres y 75 niños) se utilizaron en este estudio. Ninguno de los niños recibió lactancia materna durante el periodo de estudio. Todos los participantes adultos firmaron el consentimiento informado y el estudio fue aprobado por los comités de éticos de las instituciones involucradas en el estudio. Los datos sobre la variante de VIH-1 causante de la infección estaba disponible en 41 DBS, principalmente (97,6%) subtipos no-B y recombinantes.

Tabla 2.1. Características de la población de estudio.

	Madres	Hijos	Total
Nº de DBS	73	103	176
Nº de pacientes	69	77	146
VIH-positivos	65	2	67
<i>Naïve</i>	19	0	19
Expuestos a ARV	46	2	48
VIH-negativos	4	75	79
Edad ^a	22 años (20-25)	2,4 meses (1,2-4,9)	-
Hematocrito (%) ^b	32,9	31,7	-
Subtipo B	1	1	2
Variante no-B	37	1	38
Recombinante	29	1	30

^aExpresado en mediana (rango intercuartílico). ^bHematocrito estimado en una población de mujeres y niños africanos infectados por VIH (Mwinga et al. 2009).

Las muestras de DBS fueron recogidas por personal cualificado en Guinea Ecuatorial, llenando cada círculo de la tarjeta Whatman no.903 con dos gotas de sangre tras un pinchazo en el talón en el caso de los niños o mediante venopunción para sus madres. Se estima que un círculo saturado contiene 70 µl de sangre, siendo 46,2 µl y 47,8 µl de plasma si se asume un hematocrito del 32,9% y del 31,7% para niños y madres respectivamente, según una publicación anterior en la que se analizaron parámetros bioquímicos en mujeres y niños africanos (Mwinga et al. 2009) (**Tabla 2.1**). Los DBS se dejaron secar tras su toma durante toda la noche a temperatura ambiente. Se tomaron 2 DBS (con 5 círculos cada uno) de cada paciente, se guardaron en una bolsa de plástico con cierre hermético incluyendo dos bolsas de gel de sílice desecante y se almacenaron a -80°C en Bata. Las muestras fueron transportadas en hielo seco a España, donde fueron almacenadas a -80°C hasta su cuantificación en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1 en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

El diagnóstico de los niños se confirmó previamente siguiendo las guías de diagnóstico de la OMS (WHO 2010c; WHO 2013; WHO 2014), testando el DBS para detectar el ARN viral mediante ensayos virológicos comerciales en la primera muestra tomada cuando la mediana de edad de los niños era de 2,4 meses [rango intercuartílico (RIQ): 1,2-4,9] (**Tabla 2.1**), como se explicará en el **Capítulo 4** de esta Tesis. La infección por VIH-1 se descartó previamente en todos los DBS negativos obtenidos de los niños mediante al menos 3 ensayos virológicos comerciales, sin detectar la presencia de ácidos nucleicos del VIH-1 (ADN proviral y/o ARN viral) en el

DBS. Las técnicas cuali- y cuantitativas utilizadas fueron: kPCR, Roche COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HIV-1 (CAP/CTM) Quantitative Test v2.0 (Roche-CV-v2) y CAP/CTM Qualitative Test v1.0 (Roche-dx-v1) y v2.0 (Roche-dx-v2) (**Tabla 2.2**). La infección por VIH-1 en los niños positivos se confirmó mediante la detección del VIH-1 por 4 técnicas virológicas comerciales en dos muestras recogidas entre 1,5 y 8 meses después del nacimiento (Alvarez et al. 2016b). Antes del diagnóstico del VIH-1, ambos niños habían recibido profilaxis post-exposición en Guinea Ecuatorial y ninguno de ellos estaba en TAR. Uno estaba infectado por subtipo C y otro por el recombinante CRF02_AG.

Las madres fueron previamente diagnosticadas en el Centro de Salud María Rafols y en el Hospital Regional “Dr. Damián Roku Epite Monanga”, ambos situados en Bata (Guinea Ecuatorial), desde noviembre de 2012 hasta diciembre de 2013, siguiendo el Protocolo Nacional para el diagnóstico y la monitorización de la infección por VIH-1 en Guinea Ecuatorial (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). El diagnóstico en Bata se basó en 3 test rápidos usando muestras de sangre completa: un ensayo de primera línea (Determine HIV-1/2 de Abbott Laboratories, Hoofddorp, Holanda) y dos test rápidos de confirmación (Uni-Gold HIV de Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda y Hexagon HIV1/2 de Human Diagnostics, Wiesbaden, Alemania) (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). Además, el estatus de VIH fue confirmado en el laboratorio de Madrid en todos los DBS de las 69 madres usando un test rápido adicional (Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay), tal y como se describió previamente (Fernández McPhee et al. 2015). Entre los 71 pacientes infectados por VIH el 73,2% estaba recibiendo tratamiento antirretroviral.

Cuantificación de la carga viral de VIH-1

Las dos técnicas virológicas usadas en este estudio sólo están aprobadas para la cuantificación de la CV en plasma y DBS. Ninguna de las dos puede usarse para diagnóstico molecular de la infección en DBS y sólo la técnica de Roche está aprobada para el diagnóstico molecular precoz del VIH-1 en muestras de plasma. Estas técnicas comerciales están basadas en la qPCR, detectando distintas regiones del VIH-1 y con un límite de detección diferente en plasma y DBS (**Tabla 2.2**).

Roche-CV-v2 (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) detecta dos regiones virales (gag y LTR), con un límite de detección de <20 cp/ml en plasma y 400 cp/ml en DBS (**Tabla 2.2**). Esta metodología ha sido empleada previamente usando plasma (Pas et al. 2010; Pyne et al. 2010; Muenchhoff et al. 2014) y DBS (Sawadogo et al. 2014; Alvarez et al. 2016b). Para realizar la cuantificación de la CV se recortó un círculo

completo y se incubó en 1,1 ml de *Specimen Pre-Extraction Reagent* (Roche) a 56°C con agitación (1.000 rpm) durante 10 minutos. Los pasos de extracción, amplificación y cuantificación de la CV en muestras de DBS se llevaron a cabo utilizando el sistema COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan, según el procedimiento descrito por el fabricante.

El test kPCR es un ensayo de preparación automatizada de la muestra y cuantificación de la CV de muestras positivas para VIH-1. Detecta una región altamente conservada dentro del gen viral de la IN con un límite de detección de 37 cp/ml en plasma y entre 866-894 cp/ml en DBS (Pirillo et al. 2011; Kleshik et al. 2013; Alvarez et al. 2014) (**Tabla 2. 2**). Para realizar la cuantificación de la CV en DBS se incubó un círculo del DBS en 2 ml de buffer específico para DBS con tiocianato de guanidina a temperatura ambiente durante 30 m con una agitación suave. Los tubos se centrifugaron a 2.800 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se procesó 1,1 ml del sobrenadante con el módulo de preparación de muestras VERSANT para la extracción automática de ácidos nucleicos. Los parámetros del software de kPCR no se modificaron. En cada experimento se incluyeron dos réplicas del Calibrador A y del Calibrador B y una del control alto, del control bajo y del control negativo.

Tabla 2.2. Rendimiento de dos ensayos de cuantificación de la CV (kPCR y Roche-CV-v2) testando diferentes variantes del VIH-1 en DBS.

Características	Ensayos cuantitativos VIH-1	
	kPCR	Roche-CV-v2
Casa comercial	Siemens	Roche
Región detectada	IN	Gag + LTR
LD Plasma (1 ml)	<37 cp/ml	<20 cp/ml
LD DBS (1 círculo)	866-894 cp/ml ^a	400 cp/ml
Resultados falsos positivos (%)	Ninguno	11 (10,5%)
Resultados falsos negativos (%)	21 (29,6%)	3 (4,2%)

Datos de 71 DBS VIH-positivos y 105 DBS no infectados. kPCR, Siemens VERSANT HIV-1 RNA 1.0 kPCR assay; Roche-CV-v2, Roche CAP/CTM Quantitative test v2.0; IN, Integrasa; LTR, *Long terminal repeat*; DBS, *Dried blood spots*; LD, Límite de detección; cp/ml, copias de ARN VIH-1/mililitro; %, porcentaje; ^aLD de kPCR usando DBS: de 866 cp/ml (Kleshik et al. 2013) a 894 cp/ml (Alvarez et al. 2014; Ver **Capítulo 1** de esta **Tesis**).

El software de Roche-CV-v2 realiza una corrección automática cuando se usa el protocolo para DBS, pero los valores de viremia proporcionados por kPCR necesitan ser corregidos considerando el volumen de plasma y el hematocrito, como se ha descrito en el capítulo previo. Puesto que se desconocía el hematocrito de los pacientes incluidos en el estudio, se asumió un valor de 32,9% para los niños y del 31,7% para las madres (Mwinga et al. 2009).

Análisis estadísticos

Las CV obtenidas se convirtieron a valores \log_{10} antes del análisis estadístico. A las muestras analizadas por kPCR detectadas con CV por debajo del límite de detección (<37 cp/ml) se les asignó el valor de 37 cp/ml ($1,57 \log_{10}$ cp/ml) antes de realizar las correcciones por hematocrito y volumen de plasma. La sensibilidad y especificidad se calcularon usando MedCalc Software bvba versión 13.2.2 (**Anexo I**). La concordancia entre ensayos se determinó mediante el análisis Bland-Altman (Bland & Altman 1986). Para evaluar la capacidad de discriminación, se utilizaron curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*), obteniendo así el área bajo la curva. En estas curvas se presentan la sensibilidad y el complementario de la especificidad para distintos puntos de corte, estableciendo así el valor de CV con máxima sensibilidad y especificidad para establecer el punto de corte óptimo. Los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 13 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

RESULTADOS

Rendimiento de kPCR y Roche-CV-v2 usando DBS

En la **Tabla 2.2** se muestra el rendimiento de las dos técnicas de cuantificación de la CV evaluadas en este estudio. Al procesar los 105 DBS negativos, kPCR no detectó ningún falso positivo. Por otro lado, al usar Roche-CV-v2 en los 105 DBS no infectados se obtuvieron 11 (10,5%) falsos positivos, correspondientes a una de las madres y a 10 niños sin infectar, obteniéndose falsas viremias que van desde las 400 hasta las 2.270 cp/ml. Entre los 71 DBS VIH-positivos, se observaron resultados falsos negativos en el 29,2% de las muestras usando kPCR y en el 4,2%, casi 7 veces menos, al emplear Roche-CV-v2 (**Tabla 2.2**). La **Tabla 2.3** resume la tasa de detección y cuantificación del VIH-1 en los 176 DBS (71 infectados con VIH-1, 105 sin infectar) analizados por las dos técnicas de CV según el estatus de infección por VIH-1 y la exposición a TAR en el momento de toma de muestra. De los 71 DBS VIH-positivos (52 recogidos de pacientes expuestos a TAR y 19 de pacientes *naïve*), kPCR fue capaz de cuantificar la CV en 49 (69%) DBS, proporcionando valores de viremia indetectable en 21 (30%) casos y señalando la muestra como inválida en 1 (1,4%) paciente. Por otro lado, Roche-CV-v2 fue capaz de cuantificar la CV en 68 (95,8%) muestras, dando como negativas 3 (4,2%) muestras de 3 pacientes distintos. Con kPCR se obtuvieron resultados inválidos con frecuencia (7,4%), mientras que todas las muestras fueron procesadas correctamente por Roche-CV-v2 (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Detección y cuantificación del VIH-1 en 176 DBS según el estatus de infección por VIH-1 y la exposición a TAR en el momento de toma de muestra.

Estatus VIH-1	Nº de pacientes	Madres/hijos	Nº de DBS	Ensayos cuantitativos						Diferencia de CV en 49 DBS cuantificados por ambos test	
				kPCR			Roche-CV-v2			>0,5 log	>1log
				P	ND	INV	P	ND	INV		
Infectado	67	65/2	71	49	21	1	68	3	0	85,7% (42/49)	36,7% (18/49)
<i>Naive</i>	19	19/0	19	16	3	0	18	1	0	81,2% (13/16)	37,5% (6/16)
Expuesto a TAR ^a	48	46/2	52	33	18	1	50	2	0	87,9% (29/33)	36,4% (12/33)
No infectado	79	4/75	105	0	93	12	11	94	0		
TOTAL	146	69/77	176	49	104	13	79	97	0		

DBS, *dried blood spots*; CV, carga viral; Nº, número; TAR, tratamiento antirretroviral; kPCR, VERSANT HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) assay (Siemens); Roche-CV-v2, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 test v2.0 (Roche); P, positivo; ND, no detectado; INV, inválido. ^aExpuesto a TAR de acuerdo a las guías nacionales para la prevención de la transmisión vertical de GQ para mujeres embarazadas y sus hijos (Ministerio GQ 2009), las cuales recomiendan que todas las mujeres embarazadas infectadas por VIH reciban profilaxis con zidovudina (AZT) o TAR de gran actividad (TARGA) según el recuento de CD4 y del estadio clínico de la OMS (OMS opción A). En el caso de los niños, se recomienda AZT entre una y cuatro semanas tras el nacimiento en el caso de no recibir lactancia materna y nevirapina (NVP) para aquellos cuya madre no había recibido TAR durante más de cuatro semanas durante el embarazo.

Las guías nacionales para la prevención de la transmisión vertical de Guinea Ecuatorial recomendaban en 2012 que todas las mujeres embarazadas e infectadas por VIH-1 recibieran profilaxis con AZT o TARGA según el recuento de linfocitos T CD4 y el estadio clínico de la OMS (OMS opción A) (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). Dichas guías recomendaban tratar a los niños con AZT entre una y cuatro semanas tras el nacimiento si el niño no estaba recibiendo lactancia materna. Para aquellos niños cuyas madres no habían recibido TAR durante más de cuatro semanas en el embarazo se recomendaba tratar con NVP.

En nuestro estudio, entre las 65 madres infectadas por VIH-1, 46 (70,8%) estaban recibiendo TAR durante el programa PTMH y cuando se recogió el DBS del niño, siendo el resto de las madres *naïve*. Diecisiete (37%) de las 46 madres tratadas recibieron profilaxis con AZT durante el embarazo, mientras que 29 (63%) recibieron TARGA.

La mayor parte de los niños (78,1%) nacieron por parto vaginal. Treinta y siete (48,1%) niños de los 77 recibieron profilaxis postnatal con AZT y 41 (53,2%) niños recibieron NVP. Considerando la exposición a TAR en el momento de toma de muestra, kPCR fue capaz de cuantificar el 84,2% (16/19) de los DBS infectados de diferentes pacientes *naïve* pero solo el 64,7% (33/52) de los DBS recogidos de los 48 pacientes expuestos a TAR (**Tabla 2.3**). Sin embargo, Roche-CV-v2 pudo cuantificar el 94,7% (18/19) de los DBS VIH-positivos de pacientes *naïve* y el 96,2% (50/52) de los DBS obtenidos de pacientes expuestos a TAR (**Tabla 2.3**).

La **Tabla 2.4** muestra los valores de sensibilidad y especificidad de ambos test utilizando el panel de muestras del estudio. Roche-CV-v2 mostró una sensibilidad mayor que kPCR (95,8% vs. 70%), con resultados similares entre DBS de pacientes *naïve* y de pacientes expuestos a TAR. Sin embargo, la sensibilidad de kPCR fue menor en las muestras de pacientes tratados. Por otro lado, kPCR mostró la una especificidad del 100% en todos los pacientes, mientras que Roche-CV-v2 presentó una especificidad cercana al 90% (**Tabla 2.4**).

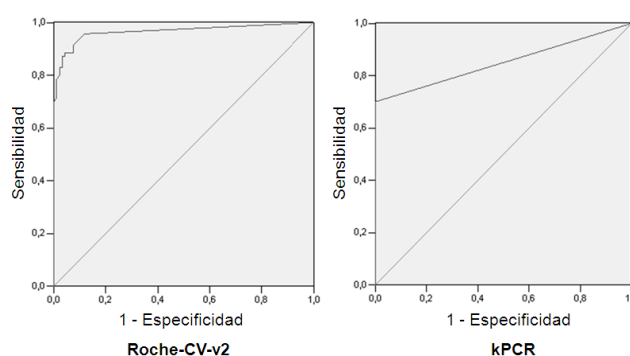
Tabla 2.4. Sensibilidad y especificidad de las dos técnicas de CV para la detección de VIH-1 en 176 DBS.

Ensayos de CV		61 DBS <i>naive</i> ^a	115 DBS expuestos a TAR ^b	Total 176 DBS ^c
Sensibilidad [95% IC]	kPCR	84,2% [60,4%-96,6%]	64,7% [50,4%-77,6%]	70% [57,9%-80,4%]
	Roche-CV-v2	94,7% [74%-99,9%]	96,2% [86,8%-99,5%]	95,8% [88,1%-99,1%]
Especificidad [95% IC]	kPCR	100% [91%-100%]	100% [93,4%-100%]	100% [96,1%-100%]
	Roche-CV-v2	90,5% [77,4%-97,3%]	90,5% [80,4%-96,4%]	89,5% [82%-94,7%]

CV, carga viral; DBS, *dried blood spots*; TAR, tratamiento antirretroviral; kPCR, VERSANT HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) assay; Roche-CV-v2, CAP/CTM v2.0, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 test v2.0; IC, intervalo de confianza. Datos calculados excluyendo las cuantificaciones inválidas. ^aLa sensibilidad y la especificidad se calcularon en 163 muestras VIH-positivas por kPCR (excluyendo 13 resultados inválidos) y en 176 muestras por CAP/CTM v2.0. Puesto que 3 muestras *naive* y 10 de pacientes expuestos a TAR resultaron inválidas por kPCR, los cálculos se realizaron en 58/61 DBS de pacientes *naive*^b y en 105/115 DBS de pacientes expuestos a TAR^c.

Para establecer el valor de CV con máxima sensibilidad y especificidad, determinando el punto de corte óptimo en cada técnica, se utilizaron curvas ROC. El área bajo la curva fue de 0,97 (Error Estándar: 0,02) para Roche-CV-v2 y de 0,85 (Error Estándar: 0,03) para kPCR, mostrando ambos ensayos una alta precisión (**Figura 2.1**). El punto de corte óptimo para Roche-CV-v2 resultó ser 2,72 \log_{10} , mientras que para kPCR fue 0 \log_{10} , siendo estos los valores de CV con la suma máxima de sensibilidad y especificidad.

Figura 2.1. Curvas ROC para Roche-CV-v2 y kPCR. La línea diagonal sirve como referencia, donde la sensibilidad es igual a 1-especificidad.



Diferencias en la cuantificación del VIH-1 usando diferentes ensayos

Los valores de CV en DBS proporcionados por kPCR oscilaron entre 774 y 1.008.928 cp/ml y Roche-CV-v2 proporcionó valores entre 400-5.310.000 cp/ml. Considerando los 49 DBS con CV >400 cp/ml (por encima de los límites de detección de ambas técnicas), la CV osciló entre 2,9-6,7 \log_{10} usando kPCR y 2,6-6,0 \log_{10} con Roche-CV-v2. Las diferencias de viremia entre los dos ensayos fueron mayores a 0,5 \log_{10} en 42/49 (87,5%) DBS, mientras que en 18 casos (37,7%) la diferencia era superior a 1 \log_{10} , siendo similar en DBS con y sin exposición a TAR en el momento de toma de muestra (37,5% vs. 36,4%) (**Tabla 2.3**). Al analizar el número de muestras detectadas según los distintos rangos de CV, la diferencia entre ensayos fue significativa cuando la CV era mayor de 10.000 cp/ml (4 \log_{10}) y en el número de muestras detectadas como negativos (**Tabla 2.5**). Entre los 71 DBS VIH-positivos, Roche-CV-v2 dio mayor proporción de muestras con CV >4 \log_{10} que kPCR (52,1% vs. 18,3%). Solamente 3 (6,1%) muestras mostraron CV más alta usando kPCR vs. Roche-CV-v2, todas con viremia cercana al límite de detección (733 cp/ml) y subtipo desconocido. La tasa de muestras positivas para VIH no detectadas fue significativamente mayor usando kPCR que Roche-CV-v2 (26,6% vs. 4,2%; $p < 0,05$).

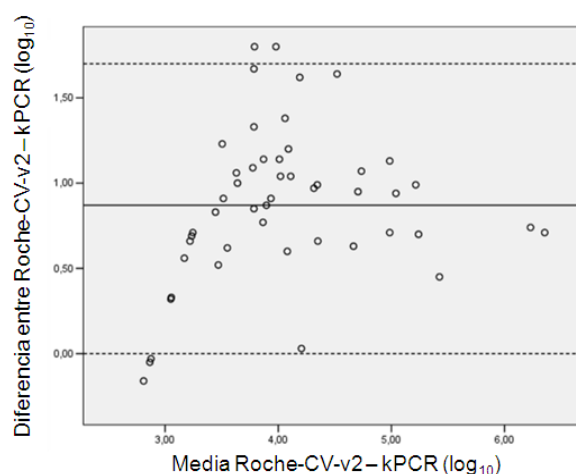
Tabla 2.5. Cuantificación del VIH-1 en 176 DBS por las dos técnicas según su carga viral.

CV (cp/ml)	71 DBS positivos			105 DBS negativos	
	kPCR	Roche-CV-v2	<i>p</i>	kPCR	Roche-CV-v2
>10.000	13 (18,3%)	37 (52,1%)	<0,05	0	0
10.000-1.001	24 (33,8%)	22 (18,3%)	NS	0	3 (2,9%)
≤1.000	12 (16,9%)	9 (31,0%)	NS	0	8 (7,6%)
1.000-866	1 (1,4%)	1 (1,4%)	NS	0	0
1.000-400	12 (16,9%)	9 (12,7%)	NS	0	8 (7,6%)
ND	21 (29,6%)	3 (4,2%)	<0,05	93 (88,6%)	94 (89,5%)
INV	1 (1,4%)	0	NS	12 (11,4%)	0

CV, carga viral; cp/ml, copias/mililitro; DBS, *dried blood spots*; kPCR, Siemens VERSANT HIV-1 RNA 1.0 kPCR assay; Roche-CV-v2, Roche CAP/CTM Quantitative test v2.0; %, porcentaje; ND, no detectado; INV, inválido; NS, no significativo. Límite de detección de kPCR usando DBS: de 866 cp/ml (Kleshik et al. 2013) a 894 cp/ml (Alvarez et al. 2014 y **Capítulo 1** de esta Tesis), Roche-CV-v2 LOD usando DBS: 400 cp/ml.

La concordancia entre los valores de CV corregidos usando kPCR y los valores obtenidos con Roche-CV-v2 se analizó mediante el método Bland-Altman (Bland & Altman 1986) en 49 pacientes con resultados de cuantificación válidos por ambas técnicas. Cuando la CV por kPCR estaba por debajo del límite de detección se le asignó el valor de $1,57 \log_{10}$, siendo este el límite de detección de dicho ensayo (**Figura 2.2**). Todas las muestras excepto 5 (89,8%) estaban dentro de los límites marcados por la desviación estándar, mostrando una buena concordancia entre las dos técnicas. Sin embargo, Roche-CV-v2 mostró una sobreestimación de la CV de $0,9 \log_{10}$ en comparación con kPCR.

Figura 2.2. Análisis de concordancia Bland-Altman entre kPCR y Roche-CV-v2.



Las líneas horizontales representan la diferencia media y la desviación estándar $\pm 1,96$.

Influencia de la variante de VIH-1 en la detección del virus y la cuantificación de la carga viral

Se comparó el rendimiento de ambos ensayos cuantitativos entre los 41 DBS con variante del VIH-1 previamente conocida entre los 71 DBS VIH-positivos. Todos menos uno estaban infectados por variantes no-B del VIH-1, incluyendo 27 (65,8%) variantes recombinantes. Las variantes testadas fueron 21 CRF02_AG, 8 subtipo C, 3 CRF22_A101, 2 URFs, 1 sub-subtipo A3, 1 subtipo B, 1 subtipo D, 1 sub-subtipo F2, 1 subtipo G, 1 CRF06_cpx and 1 CRF11_cpx.

Roche-CV-v2 fue capaz de cuantificar las 41 muestras. Sin embargo, kPCR fue capaz de detectar el ARN viral solamente en 37 (90,2%) de las 41 muestras con subtipo conocido, no detectando el virus en 3 (14,3%) de los 21 DBS infectados por la variante CRF02_AG. Estas 3 muestras, tomadas de 3 mujeres expuestas a TAR, sí

fueron cuantificadas por Roche-CV-v2, proporcionando viremias entre 1.340 y 2.380 cp/ml. Además, kPCR detectó como inválida una muestra infectada por el subtipo C tomada de un niño expuesto a TAR. Por lo tanto, Roche-CV-v2 detectó el ARN viral en todas las muestras infectadas por subtipos no-B, mientras que kPCR detectó el 85,7% y el 87,5% de las muestras infectadas por CRF02_AG y el subtipo C respectivamente.

De los 37 DBS con variante conocida y cuantificación válida por los dos ensayos, se observaron diferencias en la CV superiores a $0,5 \log_{10}$ en 35 (94,6%) muestras (excepto en 2/18 variantes CRF02_AG), y mayor a $1 \log_{10}$ en 15 (40,5%) DBS (excepto en 9/18 CRF02_AG y 1/3 subtipo C). En general, la mediana de la sobreestimación de la CV por Roche-CV-v2 en comparación con kPCR fue de $1 \log_{10}$ (RIQ: 0,7-1,1).

DISCUSIÓN

En este capítulo se compararon dos ensayos de cuantificación de la CV en DBS tomados de madres e hijos con y sin infección por VIH-1 procedentes de Guinea Ecuatorial. La cuantificación y monitorización de la CV consigue grandes beneficios, incluyendo la posibilidad de realizar un diagnóstico precoz del VIH-1 en niños y de detectar problemas en la adherencia al tratamiento o fracaso terapéutico antes de la selección de MDR que, en caso de no detectarse, limitarían las opciones de terapia futuras (WHO 2010a; Lynen et al. 2010; Keiser et al. 2011; Sigaloff et al. 2011; Barth et al. 2012). El sencillo proceso de toma de DBS es ideal para zonas con acceso limitado a técnicas virológicas para la monitorización de la infección por VIH-1, incluyendo la cuantificación de la CV. A pesar de que el límite de detección en muestras de DBS es elevado debido al poco volumen de sangre recogido en la tarjeta, se ha visto en el **Capítulo 1** que existe una alta correlación entre muestras pareadas de plasma y DBS utilizando kPCR (Pirillo et al. 2011; Kleshik et al. 2013; Alvarez et al. 2014), al igual que fue publicado para Roche-CV-v2 (Ouma et al. 2013).

En el **Capítulo 1** ya se señaló que la contribución del ADN proviral en la cuantificación de la CV en DBS es mayor en muestras que presentan una CV plasmática baja, tras observar una sobreestimación usando DBS en comparación con el plasma en muestras con CV plasmática por debajo de 1.000 cp/ml (Alvarez et al. 2014). Ello corrobora resultados de otros estudios que también muestran una sobreestimación de la CV empleando DBS (Sawadogo et al. 2014). En este estudio, ambos métodos de cuantificación de la CV del VIH-1 comparados, al igual que la mayoría de otros ensayos para el mismo fin, están basados en la qPCR con una

extracción automatizada previa de ácidos nucleicos a partir de sangre seca del paciente infectado. Ello mejora la detección de la CV en muestras con baja carga plasmática de VIH-1 en comparación con técnicas manuales o semi-manuales (Manavi 2008; Do et al. 2011). Así, estudios anteriores han encontrado una CV detectable en plasma más elevada usando Roche-CV-v2 que con la versión previa semi-automatizada de Roche, Cobas Amplicor (Lima et al. 2009).

La detección del ARN viral por kPCR fue peor en DBS de pacientes tratados comparado con Roche-CV-v2, probablemente debido al mayor límite de detección en DBS (cerca de las 900 cp/ml vs. 400 cp/ml). Por lo tanto, aquellos pacientes que estén recibiendo TAR y que hayan alcanzado supresión viral podrían ser detectados como negativos usando DBS con kPCR cuando la viremia está por debajo del límite de detección de dicho ensayo. Sin embargo, si la supresión viral fuera $<400\text{c/ml}$ el VIH-1 no podría ser detectado ni cuantificado por ninguno de los dos ensayos usando DBS.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que si la cuantificación de la CV empleando DBS se utiliza para el diagnóstico precoz infantil o para detectar fracaso terapéutico, es decir, esperando valores altos de CV, sería necesario considerar el ensayo con mayor especificidad de los comparados, siendo mejor para ello kPCR que Roche-CV-v2 según los datos de nuestro estudio. Así, con kPCR no se obtuvieron resultados falsos positivos, mientras que con Roche-CV-v2 se obtuvo una tasa de falsos positivos del 10,5% al proporcionar valores de CV en 11 muestras VIH-negativas. Por otro lado, el ensayo con mayor sensibilidad fue Roche-CV-v2, al presentar una menor tasa de resultados falsos negativos que kPCR (4,2% vs. 29,6%). El efecto de la exposición a TAR fue mayor al usar kPCR, probablemente debido al mayor límite de detección que presenta esta técnica al usar DBS. Los resultados presentados en este capítulo muestran una alta concordancia entre kPCR y Roche-CV-v2 usando muestras de sangre seca. No obstante, los valores de CV fueron, de media, $1 \log_{10}$ más altos al usar Roche-CV-v2. Además, una de cada diez cuantificaciones resultó ser un falso positivo con este ensayo, con valores de CV inferiores a 2.300 cp/ml, mostrando una menor especificidad de Roche-CV-v2 a pesar de detectar dos regiones del genoma viral (gag y LTR). La obtención de valores más altos con Roche-CV-v2 usando DBS podría deberse a una mayor contribución de la amplificación por qPCR del ADN proviral asociado a la célula en comparación con kPCR. Curiosamente, no se observaron falsos positivos con kPCR, detectando esta técnica una única región viral (IN), por lo que podría ser una buena opción para usar en el diagnóstico precoz de niños sin TAR o para detectar fracasos virológicos con

CV>1.000 cp/ml, como la OMS propone en países de recursos limitados empleando DBS (WHO 2015).

La baja especificidad de Roche-CV-v2 podría tener importantes consecuencias a nivel clínico durante el diagnóstico de VIH-1. Un resultado falso positivo conduciría a un diagnóstico erróneo de la infección y, en consecuencia, a someter al paciente a un tratamiento innecesario. También tendría gran relevancia en el diagnóstico precoz en recién nacidos puesto que este requiere técnicas moleculares como las evaluadas en este capítulo, pudiendo sobreestimar también las tasas de transmisión vertical. Nuestro estudio no es el primero que muestra falsos positivos y sobreestimaciones de la viremia usando la tecnología cuantitativa CAP/CTM. Además, con la versión 2.0 del test cualitativo CAP/CTM, el único ensayo aprobado para diagnóstico precoz del VIH-1 usando DBS y que detecta las mismas regiones del virus, también se han publicado falsos positivos (Alvarez et al. 2016b). El diseño limitado de cebadores y sondas que utiliza esta tecnología podría explicar la alta tasa de falsos positivos.

La sobre- o subestimación observadas al usar diferentes técnicas de cuantificación de la CV podría tener también importantes consecuencias en la monitorización del tratamiento, principalmente a la hora de detectar eventos de fracaso virológico. El umbral de fracaso virológico usando DBS se ha establecido por encima de 1.000 cp/ml durante el seguimiento clínico en regiones con limitaciones para el procesamiento de muestras de sangre completa siguiendo las recomendaciones recogidas en las guías de la OMS de 2013 (WHO 2013). Sin embargo, en otros estudios se ha reforzado que la detección de fracaso del TAR usando DBS es útil solo cuando la CV es superior a 5.000 cp/ml (Sawadogo et al. 2014), a pesar de que el umbral podría reducirse a 3.000 cp/ml si se usasen técnicas específicas para la extracción y amplificación del ARN viral y así evitar la contaminación por ADN proviral durante la cuantificación de la CV (Sawadogo et al. 2014). Considerando los resultados descritos en este capítulo, se recomienda realizar la cuantificación de la CV siempre con la misma técnica durante la monitorización de la infección de un paciente para reducir sobre- o subestimaciones en la viremia asociadas al ensayo de CV, pudiendo ser interpretadas como eventos de fracaso terapéutico o con falsa supresión viral, respectivamente. En el primer escenario se podrían reducir los cambios del régimen TAR innecesarios mientras que en el segundo se podrían favorecer cambios de terapia y fomentar la adherencia.

La variabilidad genética del VIH-1 puede llevar a una subestimación e incluso a la no detección del ARN viral usando diferentes metodologías (Von Truchsess et al. 2006; Holguín et al. 2008b; Ruelle et al. 2009; Luft et al. 2011; Rouet et al. 2011;

Mouinga-Ondémé et al. 2014; Bruzzone et al. 2014), al igual que se ha reportado en otros virus ARN (Kessler et al. 2013). La baja sensibilidad de kPCR observada al cuantificar ciertas variantes del VIH-1 no sólo ocurre usando DBS, sino también usando plasma u otro tipo de muestra, y está asociada al diseño de las sondas y cebadores que usa la técnica para detectar al VIH-1, los cuales pueden fallar en el paso de hibridación con el ARN viral requerido para amplificar y detectar la región por qPCR. Los diferentes ensayos de CV deberían probarse en un amplio número de variantes no-B del VIH-1 para comparar el rendimiento de la cuantificación de todos los subtipos no-B y recombinantes del VIH-1. Ya se han publicado previamente discrepancias en los valores de CV usando diferentes ensayos al testar variantes no-B, incluyendo muestras de pacientes infectados por el CRF02_AG (Holguín et al. 2008b) y en el **Capítulo 1** de la Tesis ya se observó que 3 CRF02_AG y un subtipo C tuvieron problemas en la cuantificación de la CV usando kPCR.

Por todo ello, es necesario reforzar la importancia del subtipaje del VIH-1 a la hora de hacer pruebas virológicas. Sería de gran utilidad hacer estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en los países antes de implantar las técnicas de CV y probar la eficacia de varias técnicas de CV para la cuantificación en paralelo de un panel de muestras con cepas representantes de todas las variantes que circulan en la zona. Sólo así se implementaría la mejor técnica para cuantificación de las variantes circulantes que infectan a la población con VIH-1 de cada país.

El trabajo descrito en este capítulo fue publicado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Álvarez P, Martín L, Prieto L, Obiang J, Vargas A, Avedillo P, Rojo P, Fernández McPhee C, Benito A, Ramos JT y Holguín A. *HIV-1 variability and viral load technique could lead to false early infant HIV-1 diagnosis and erroneous virological failure identification using DBS*. Journal of Infection. 2015;71:368-376. Índice de impacto: 4,44. Cuartil 1.

CAPÍTULO 3

Evaluación de cuatro ensayos viroológicos comerciales para el diagnóstico precoz infantil del VIH-1 usando DBS

ANTECEDENTES

La transmisión perinatal del VIH-1 causa una alta mortalidad infantil. En países de recursos limitados, en torno al 35-52% de los niños infectados por VIH-1 que no reciban ningún tipo de intervención terapéutica morirán antes de cumplir los dos años (Newell et al. 2004). Se necesita un diagnóstico precoz del VIH-1 usando técnicas moleculares en niños nacidos de madres infectadas por el virus para iniciar cuanto antes el TAR y así reducir la mortalidad relacionada con el VIH-1 y la morbilidad a largo plazo (Violari et al. 2008). Sin embargo, no todos los ensayos de diagnóstico molecular y protocolos tienen el mismo rendimiento (Monleau et al. 2014; Smit et al. 2014). El objetivo de este estudio fue comparar el rendimiento de 4 técnicas virológicas comerciales para el diagnóstico precoz infantil del VIH-1 en un panel de DBS de niños expuestos al virus en Guinea Ecuatorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y criterio de selección

A lo largo de los últimos años se han realizado grandes esfuerzos en Guinea Ecuatorial para ampliar los programas de PTMH (UNAIDS 2014). El Programa Nacional de PTMH de Guinea Ecuatorial recomendaba visitas de asesoramiento clínico a los niños expuestos al VIH-1 programadas desde las primeras semanas de vida hasta los 18 meses de edad y el diagnóstico estaba basado en pruebas serológicas (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). Es por ello, que las visitas de rutina incluían un seguimiento clínico general y pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH para todos los niños expuestos al virus al haber nacido de madres infectadas por VIH-1, ya que el diagnóstico precoz no estaba aún implementado en el país.

En nuestro estudio, 68 madres infectadas por VIH-1 y sus respectivos hijos fueron evaluados y reclutados desde noviembre de 2012 hasta diciembre de 2013 para participar en el programa nacional de PTMH llevado a cabo en el Hospital Regional de Bata y el Centro de Atención Primaria María Rafols en Bata, Guinea Ecuatorial (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). En estos dos centros, junto con el hospital de Malabo, fue donde se centralizó el programa nacional de PTMH en Guinea Ecuatorial. Por tanto, la población de estudio representaba el 100% de las madres que acudieron al programa en la ciudad de Bata. El estudio fue diseñado siguiendo el plan de visitas clínicas recomendadas en el Programa Nacional. Todas las muestras se recogieron durante las visitas clínicas de rutina.

Los adultos participantes en el estudio dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por los comités éticos del Hospital Regional de Bata (Guinea Ecuatorial) y el Hospital Universitario de Getafe en Madrid (España). Los niños que murieron durante el periodo de estudio antes de ser diagnosticados o aquellos en los que la muestra de la madre no llegó al laboratorio fueron excluidos.

Guías de PTMH en Guinea Ecuatorial

Las guías nacionales del programa de PTMH en Guinea Ecuatorial recomendaban en 2012, año en el que comenzó el estudio, que todas las mujeres embarazadas infectadas por VIH-1 debían recibir profilaxis con AZT o TARGA dependiendo del recuento de CD4 y el estadio clínico de la OMS (OMS opción A) (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). En la **Introducción** se explicó en más detalle el TAR durante el embarazo y parto en las madres y la profilaxis en los niños recogidos en las guías nacionales en Guinea Ecuatorial. Puesto que el diagnóstico molecular no está aún disponible en el país, los pediatras informaron a las madres del diagnóstico final siguiendo las guías nacionales (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). Se descartó la infección por VIH-1 en niños que no habían recibido lactancia materna cuando dieron negativo en dos test serológicos (Determine HIV 1/2 Test, Abbott Diagnostic Division, Hoofddorp, Holanda) realizados en muestras diferentes a los 6 meses de edad o más. Los niños se consideraron como infectados cuando 3 test rápidos resultaron positivos a los 18 meses de edad: Determine, Uni-Gold Recombigen HIV-1/2 (Trinity Biotech, Bray, Co. Wicklow, Irlanda) y Hexagon (Human Diagnostic, Wiesbaden, Alemania).

Toma de muestra

Las muestras se recogieron en las tarjetas Whatman 903. Los DBS de los niños se recogieron tomando dos gotas de sangre en cada uno de los 5 círculos de la tarjeta tras un pinchazo en el talón. Cuando el círculo está saturado contiene aproximadamente 70 µl de sangre. Se recogieron dos tarjetas de DBS para cada niño, excepto en 3 casos en los que solo se pudo tomar una tarjeta. Además, se tomaron muestras longitudinales para confirmar los resultados de aquellos niños con, al menos, un resultado positivo en las técnicas virológicas comerciales. El tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su procesamiento para la cuantificación de la CV fue entre 1 y 3 meses.

Las tarjetas de DBS se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente en el hospital. Una vez secas, se guardaron en bolsas con cierre hermético y dos bolsitas desecantes, fueron almacenadas a -20°C y posteriormente se transportaron en hielo

seco para mantener la integridad de los ácidos nucleicos. Las muestras fueron transportadas en hielo seco a España, donde fueron almacenadas a -80°C hasta su cuantificación en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1 en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, puesto que los DBS requieren una temperatura mínima de almacenaje de -20°C para su uso con técnicas virológicas.

Pruebas de laboratorio

Todos los experimentos de cuantificación de la viremia del VIH-1 se llevaron a cabo en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1 (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España). Las cuatro técnicas virológicas comerciales se realizaron en Madrid usando un círculo completo del DBS para cada una: Roche-dx-v1, Roche-dx-v2, Roche-CV-v2 y kPCR quantitative assay (Kleshik et al. 2013; Alvarez et al. 2014). En la **Tabla 3.1** se describen las características de las cuatro técnicas. Todos los ensayos, excepto Roche-dx-v2, se consideraron para uso en investigación usando DBS, puesto que aún no está aprobado su uso para diagnóstico con este tipo de muestra (**Tabla 3.1**). Para garantizar el máximo rendimiento de cada ensayo en este trabajo, todos los experimentos se realizaron con la asistencia de los especialistas de cada casa comercial (Roche y Siemens) en Madrid, España, usando las plataformas automáticas específicas.

Tabla 3.1. Características de las técnicas virológicas comerciales.

	Ensayos cuantitativos		Ensayos cualitativos	
	kPCR	Roche-CV-v2	Roche-dx-v1	Roche-dx-v2
Casa comercial	Siemens	Roche	Roche	Roche
Región detectada	IN	Gag + LTR	Gag	Gag + LTR
Límite de detección en plasma (1,1 ml)	37 cp/ml	<20 cp/ml	530 cp/ml	<20 cp/ml
Límite de detección en plasma (1 círculo)	866 ^a -894 ^b cp/ml	400 cp/ml	1.090 cp/ml	<300 cp/ml
Aprobado para diagnóstico precoz usando plasma	No	Sí	No	Sí
Aprobado para diagnóstico precoz usando DBS	No	No	No	Sí

kPCR, VERSANT HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) assay; Roche-VL-v2, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Test v2.0; Roche-dx-v1, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Qualitative Test v1.0; Roche-dx-v2, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Qualitative Test v2.0; IN, integrasa; LTR, repetición larga terminal; cp/ml, copias/mililitro; DBS, *Dried blood spots*; ^{a,b} Límite de detección en DBS según Kleshik et al. 2013 y Alvarez et al. 2014, respectivamente. El método de extracción de ADN/ARN de los 4 métodos se basa en la sílice.

Roche CAP/CTM HIV-1 Qualitative Test versiones 1.0 y 2.0 y Quantitative Test versión 2.0

El CAP/CTM HIV-1 Qualitative Test es un ensayo basado en la qPCR que amplifica simultáneamente el ADN proviral y el ARN viral del VIH-1. En cada experimento se incubó 1 círculo del DBS en 1,1 ml de buffer pre-extracción a 56°C durante 10 m con agitación continua (1.000 rpm). A continuación, se procesó el eluido para la detección de ácidos nucleicos usando el sistema automático Roche CAP/CTM. El test cuantitativo Roche-CV-v2 es un ensayo de carga viral cuyo software corrige automáticamente el valor de hematocrito para estimar la CV del DBS corregida a cp/ml en plasma. Tanto para los ensayos cualitativos como para el cuantitativo se realizó el mismo protocolo de procesamiento de muestra.

Siemens VERSANT HIV-1 RNA v1.0 (kPCR) Quantitative Assay

El ensayo kPCR es un ensayo automático de cuantificación de la CV basado en la qPCR. Un círculo se incubó durante 30 m a temperatura ambiente en 2ml de buffer de lisis específico para DBS (Siemens, no disponible para su venta) que incluía tiocianato de guanidina. A continuación se procesaron 1,1 ml del sobrenadante para la extracción automática de ácidos nucleicos. La programación del software se realizó siguiendo el protocolo sin modificaciones como se ha descrito en los **Capítulos 1 y 2**. Puesto que se desconocía el valor del hematocrito, se asumió un valor medio del 33% (Alvarez et al. 2014).

Resultado diagnóstico de VIH-1 tomado como referencia

En este trabajo se siguieron las recomendaciones de la OMS para el diagnóstico precoz del VIH-1, pero realizando cuatro técnicas virológicas comerciales en vez de una (WHO 2014). Se declaró como infectados por VIH-1 a aquellos niños con resultado positivo por las cuatro técnicas en dos DBS diferentes. Ninguna técnica se consideró como *gold standard*, ya que la OMS no menciona ningún ensayo concreto en sus recomendaciones (WHO 2010a; WHO 2010b; WHO 2013; WHO 2014). Por otro lado, se diagnosticaron como negativos a aquellos niños con resultado negativo por los cuatro ensayos en la primera muestra tomada a las 4-6 semanas de edad.

En el caso de aquellos niños en los que se obtuvieron resultados discrepantes entre las cuatro técnicas virológicas comerciales al procesar la primera muestra se volvieron a realizar, al menos, 3 de las 4 técnicas virológicas en una nueva muestra. Además, se tuvo en cuenta la información proporcionada por los test serológicos realizados en la última muestra recogida para identificar a aquellos niños que habían serorrevertido (WHO 2014). En este estudio, la serorreversión vino definida por un resultado negativo

en un ELISA (Architect System, Abbott Diagnostics, Madrid, España) eluyendo un círculo durante una hora a temperatura ambiente en 700 µl de buffer de elución Nuclisens y un resultado negativo por western blot (New Lav Blot I, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) usado como test confirmatorio. La ausencia de infección por VIH-1 en niños con resultados negativos por las 4 técnicas virológicas comerciales se confirmó en Guinea Ecuatorial realizando el test serológico Determine HIV 1/2 en dos muestras diferentes de los mismos niños cuando habían cumplido 9 meses.

Para concluir un diagnóstico definitivo, se analizaron todos los resultados obtenidos de las técnicas virológicas y serológicas realizados para cada paciente, incluyendo las muestras longitudinales. Los resultados se discutieron con los pediatras involucrados en el estudio para ver si el estado clínico del paciente apoyaba la decisión tomada sobre el diagnóstico.

Subtipaje del VIH-1 e identificación de mutaciones de resistencia en las madres de los niños infectados

Se recogieron DBS de las madres de aquellos pacientes que resultaron infectados para confirmar la coincidencia de la variante del VIH-1 del hijo con la de su madre identificada por análisis filogenético de la región *pol* y así descartar contaminaciones. Además se analizó la secuencia del genoma viral en las madres e hijos para identificar si se habían transmitido virus con resistencias a antirretrovirales (WHO 2012b; Á. Holguín et al. 2013). Los procedimientos se describen en detalle en el **Capítulo 4** de la Tesis.

Análisis estadístico

Se calcularon la mediana y los RIQ de la edad y la CV de las madres y de los hijos. Los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 13.

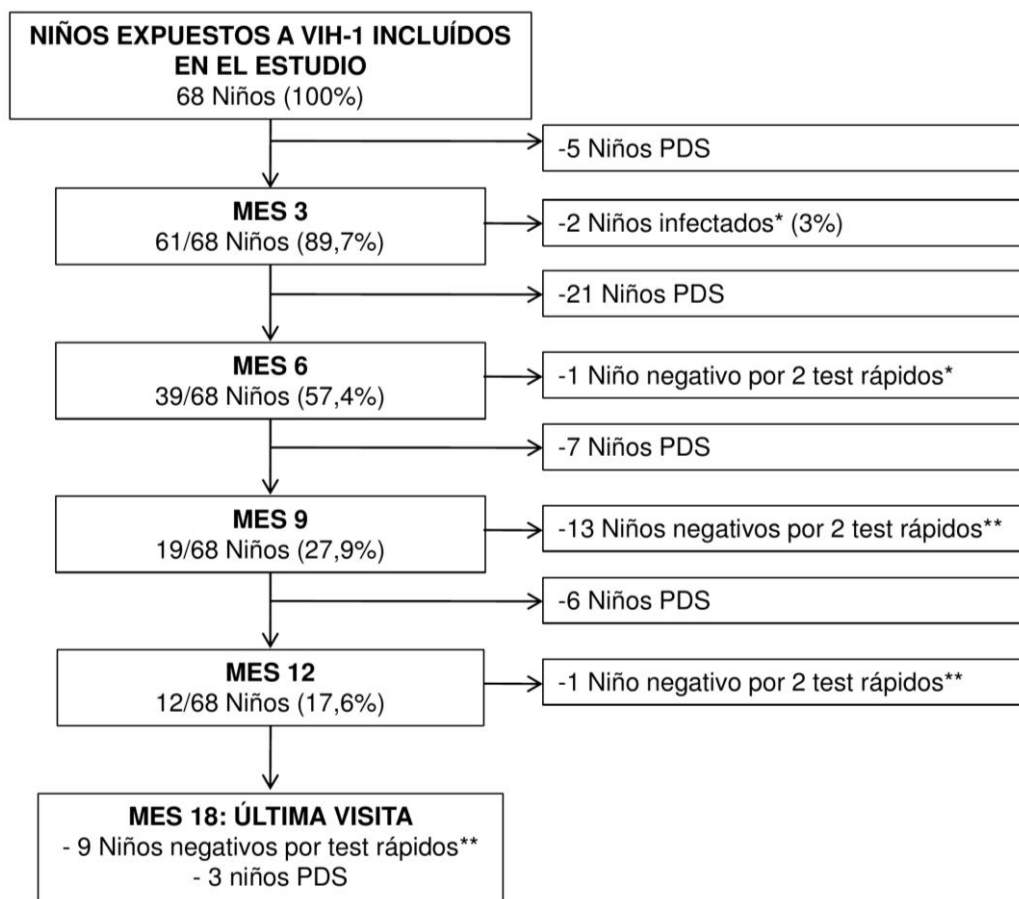
RESULTADOS

Descripción de la población

Entre los 72 niños identificados como expuestos al VIH-1 en el cribado realizado en Guinea Ecuatorial, 68 cumplían los criterios de inclusión del estudio. Tres niños fueron excluidos por la falta de muestra de su madre, mientras que un niño falleció antes de poder realizar el diagnóstico de VIH-1. La mediana de edad de las madres fue de 22 años (RIQ: 19-35) y el 88,4% estaban en el estadio clínico I de la OMS. Veinte (29,4%) habían recibido profilaxis durante el embarazo, mientras que 28 (41,2%) habían recibido TARGA. Se les recomendó a las 68 madres continuar realizando las visitas de

seguimiento hasta que los niños cumplieren los 18 meses de edad. En la **Figura 3.1** se muestra el diagrama de flujo con las visitas de seguimiento.

Figura 3.1. Diagrama de flujo de las visitas de seguimiento según el protocolo de PTMH de Guinea Ecuatorial.



*Estos dos pacientes salieron del estudio de niños expuestos al VIH cuando empezaron el tratamiento antirretroviral. **Se consideraron como no infectados a aquellos niños con dos resultados negativos por el test rápido Determine HIV 1/2 (Abbott Diagnostic Division, Hoofddorp, Holanda) en dos muestras diferentes. A pesar de que en el estudio se reclutaron 68 pacientes antes de que estos cumplieran los 3 meses de edad, en 15 casos se tomó la muestra de DBS después de esa edad. No se muestran las visitas anteriores a los 3 meses. PDS, pérdida de seguimiento.

Ninguno de los 68 niños participantes en el estudio recibió lactancia materna, 60 (88,2%) nacieron mediante parto vaginal y 36 (52,9%) eran niñas. Ningún niño había recibido TAR de primera línea antes de la toma del DBS, aunque 46 (67,6%) recibieron profilaxis sólo con AZT y 10 de ellos (14,7%) recibieron AZT+NVP. La primera muestra se tomó cuando la mediana de edad de los niños era de 2,2 meses (RIQ: 1,2-4,9).

Diagnóstico molecular del VIH-1 en población pediátrica usando DBS

En este estudio se realizaron cuatro técnicas virológicas comerciales para diagnosticar a 68 niños utilizando el primer DBS recogido, excepto con Roche-dx-v2, técnica con la cual no se pudieron diagnosticar a 11 pacientes debido al volumen escaso de muestra sobrante (**Tabla 3.2**). En 49 (72%) muestras no se detectó el VIH-1 por ninguna de las técnicas utilizadas. En el caso de 3 pacientes, solo 3 de las 4 técnicas estaban disponibles para hacer el diagnóstico, mientras que en los 46 restantes se pudieron realizar los 4 ensayos.

Tabla 3.2. Resultados del diagnóstico molecular del VIH-1 en el primer DBS de la población de estudio.

	Ensayos cuantitativos		Ensayos cuantitativos	
	kPCR	Roche-VL-v2	Roche-dx-v1	Roche-dx-v2
Núm. de pacientes	68	68	68	57
No testados	0	0	0	11 ^a
Positivo	2 (3%)	10 (15%)	11 (16%)	4 (7%)
Negativo	66 (97%)	58 (85%)	57 (84%)	51 (90%)
Inválido	0	0	0	2 (3,5%)
Tasa de falsos positivos	0	11,8%	13,2%	3,5%

kPCR, VERSANT HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) assay; Roche-VL-v2, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Test v2.0; Roche-dx-v1, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Qualitative Test v1.0; Roche-dx-v2, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Qualitative Test v2.0; IN, integrasa; LTR, repetición larga terminal. ^aOnce muestras no se pudieron procesar con este ensayo.

Dos (2,9%) pacientes (P1 y P2) obtuvieron resultados positivos por las cuatro técnicas, presentando una viremia alta ($>5 \log_{10}$). Estos niños comenzaron el TAR en Guinea Ecuatorial cuando se informó del primer resultado, siguiendo las recomendaciones de la OMS. Para confirmar la infección se recogió una segunda muestra tras haber empezado el tratamiento y permanecieron en seguimiento clínico para monitorizar la infección. La infección por VIH-1 se confirmó a los 18 meses de edad mediante test serológicos realizados en Guinea Ecuatorial. Ambos niños estaban infectados por la misma variante que su madre (CRF02_AG y subtipo C), lo que permitió descartar contaminaciones durante el procesamiento de sus muestras. P1 nació por parto vaginal y recibió profilaxis con AZT durante cuatro semanas, mientras que su madre había recibido profilaxis con AZT en la semana 28 del embarazo. P2 nació por cesárea, había recibido profilaxis postnatal con AZT durante una semana y su madre recibió profilaxis con AZT en el tercer trimestre del embarazo. Tras el primer diagnóstico positivo ambos niños comenzaron TARGA, mostrando resultados positivos por las 4 técnicas en una segunda muestra (**Figura 3.2**).

Figura 3.2. Resultados positivos y discrepantes del diagnóstico molecular y serológico del VIH-1.

ID	Edad (meses)	Técnicas virológicas comerciales				Test serológicos		Diagnóstico definitivo
		Cuantitativas (CV en cp/ml)		Cualitativas		ELISA	Western Blot	
		Siemens kPCR	Roche- VL-v2	Roche- dx-v1	Roche- dx-v2			
P1	1,5	723.866	3.990.000					Positivo
	4,3	962.316	5.130.000					
P2	3,8	78.348	385.000					Positivo
	5,4	17.096	153.000					
	8		82.200					
P3	1,5							Negativo
	6,4							
	13,7							
P4	2,5		492					Negativo
	7,1							
	14							
P5	1,6		400					Negativo
	7,2		1.590					
	9,6							
	13,3							
P6	1,6		1.100					Negativo
	5,3							
	12,3							
P7	1,4		513					Negativo
	4							
P8	3,5		2.270					Negativo
	9,1							
	13,1							
P9	2,3		529					Negativo
	8,3							
	12							
P10	1,5							Negativo
	7,1							
	11							
P11	1,7							Negativo
	5,9							
P12	3,5							Negativo
	6,3							
P13	2,8							Indeterminado
	7,1							
P14	3,6		400					Negativo
	6,4		400					
	12,1							
P15	2,4							Negativo
	5,8							
	9,1							
P16	2,2		400					Negativo
	7,8							
P17	1,5							Indeterminado
P18	2,4							Indeterminado
P19	4,8							Indeterminado

CV, carga viral; cp/ml, copias/mililitro; Siemens kPCR, VERSANT HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) assay; Roche-VL-v2, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Test v2.0; Roche-dx-v1, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Qualitative Test v1.0; Roche-dx-v2, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HIV-1 Qualitative Test v2.0; ELISA, Architect System (Abbott Diagnostics); Western Blot, BioRad Western Blot. Código de colores: rojo, positivo; verde, negativo; amarillo, resultado inválido; naranja, resultado indeterminado.

Resultados discrepantes entre las cuatro técnicas virológicas comerciales

En 17 (25%) de los 68 niños se observaron resultados discrepantes cuando se realizó el diagnóstico por las cuatro técnicas virológicas comerciales utilizando el primer DBS recogido de cada paciente. Solo algunos ensayos detectaron el virus proporcionando valores de CV con una mediana de 502,5 cp/ml (RIQ: 400-671,75) (**Figura 3.2**). Entre estas muestras discrepantes se detectaron 15 como positivas por una técnica, mientras que solo dos niños dieron como positivo en dos técnicas, todo ello considerando solo el diagnóstico realizado en la primera muestra tomada. En 8 de los 17 niños con resultados discrepantes no se pudo realizar el diagnóstico en el primer DBS recogido con Roche-dx-v2 debido a la falta de muestra.

Puesto que las guías de la OMS no mencionan ninguna técnica como *gold standard* para el diagnóstico precoz infantil del VIH-1 de niños expuestos o sobre cómo proceder cuando se obtienen resultados discrepantes empleando técnicas distintas en la misma muestra, se les solicitó a los pediatras involucrados en el estudio la toma de nuevos DBS para repetir el diagnóstico virológico y aclarar así el estado de la infección por VIH-1 en estos 17 niños (**Figura 3.2**). Fue posible recoger un segundo DBS de 14 niños entre 2,4-14 meses tras la toma de la primera muestra. Se perdió el seguimiento de los otros 3 niños.

En 10 de los 14 niños con resultados discrepantes y con muestra longitudinal disponible, las técnicas que habían dado como resultado positivo en la primera muestra proporcionaron resultados negativos en la segunda. El segundo DBS dio resultado positivo en dos niños (P5 y P14) por Roche-VL-v2 pero resultó negativo en nuevas muestras longitudinales. Este ensayo no se pudo realizar en un caso debido a la falta de muestra de ese paciente.

Siguiendo las guías nacionales (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009), 13 (76,5%) de los 17 pacientes con resultados discrepantes fueron diagnosticados en Guinea Ecuatorial definitivamente como no infectados en las visitas de seguimiento clínico, diagnóstico basado en dos resultados negativos en pruebas serológicas. En el caso de 4 pacientes se perdió el seguimiento clínico (P13, P17, P18 y P19) antes de poder confirmar el estado de la infección (**Figura 3.2**). Por ello, a pesar de que se obtuvieron resultados negativos por la mayoría de las técnicas virológicas en los DBS disponibles de estos 4 niños, los pediatras no pudieron comunicarles un diagnóstico definitivo a las madres porque no acudieron a las visitas clínicas para realizar el diagnóstico serológico a los 18 meses de edad.

Cuando se realizó el diagnóstico serológico mediante ELISA y *western blot* en el último DBS disponible, recogido a los 4-14 meses de edad, se confirmó la ausencia de anticuerpos anti-VIH, o serorreversión, en 12 de los 17 niños. En un caso (P15), el estado serológico resultó indeterminado a pesar de que todas las técnicas virológicas proporcionaron resultados negativos en los DBS longitudinales. En los otros 4 niños (P13, P17, P18 y P19), el DBS recogido cerca a la fecha de nacimiento mostró un resultado positivo (**Figura 3.2**). Se les informó de los resultados de las técnicas virológicas a los pediatras de Guinea Ecuatorial en el momento en el que fueron generados y ellos informaron a las madres del diagnóstico definitivo de los niños.

En cuanto al seguimiento clínico, sólo 39, 19, 12 y 9 niños acudieron a las visitas de los 6, 9, 12 y 18 meses, respectivamente (**Figura 3.1**). Tan solo 26 niños completaron el seguimiento hasta que se pudo confirmar (2 niños, P1 y P2) o descartar (24 niños) la infección por VIH-1 en Guinea Ecuatorial utilizando test serológicos. Entre los 24 niños no infectados se incluyen 11 de los 49 niños con resultados negativos por las cuatro técnicas virológicas comerciales y 13 de los 17 pacientes con resultados discrepantes. Estos 24 niños finalizaron las visitas de seguimiento. En Guinea Ecuatorial fue posible realizar el diagnóstico serológico a los 9 meses de edad a 30 (44%) de los 68 niños incluidos en el estudio. Entre ellos, 14 (46,7%) resultaron seronegativos y 16 (53,3%) seropositivos.

En este estudio no se obtuvieron resultados falsos negativos por ninguna de las técnicas moleculares. Sin embargo, teniendo en cuenta el diagnóstico realizado en el primer DBS tomado, se observaron 8 falsos positivos (11,8%) con Roche-VL-v2, 9 (13,2%) con Roche-dx-v1, 2 (3,5%) con Roche-dx-v2 y ninguno con kPCR (**Tabla 3.2** y **Figura 3.2**). Los resultados falsos positivos proporcionados por la técnica cuantitativa de Roche dieron valores de viremia en un rango de 400-2.270 cp/ml (**Figura 3.2**).

DISCUSIÓN

A pesar de la ampliación de los programas de PTMH, 220.000 niños se infectaron por VIH-1 a nivel mundial en 2014. Muchos niños no se benefician de los programas de PMTH debido a las tasas de pérdida de seguimiento, principalmente en países de recursos limitados (Sibanda et al. 2013). En Guinea Ecuatorial se estima que tuvieron lugar 2.100 infecciones en niños menores de 14 años. En este estudio se muestra una alta tasa de pérdida de seguimiento, coincidiendo con lo publicado anteriormente (Badillo-Navarro et al. 2014), lo cual es importante teniendo en cuenta que el programa PTMH estaba centralizado en Bata durante el periodo de estudio en los centros

clínicos donde se tomaron las muestras analizadas. Esto destaca la necesidad de mejorar la retención de los pacientes durante los programas de PTMH en el país. La disponibilidad de test de *point-of-care* para diagnóstico precoz podría resolver este problema, al reducir el tiempo de obtención de los resultados (Jani et al. 2014). La OMS considera como no infectado a niños que no hayan recibido lactancia materna y que tengan un resultado negativo por una técnica virológica en una muestra tomada a las 4-6 semanas de vida. Sin embargo, las técnicas virológicas comerciales no están disponibles en Guinea Ecuatorial y en las guías nacionales solo se menciona el uso de test rápidos (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). En consecuencia, los pediatras confirmaron la ausencia de infección por VIH-1 en aquellos niños con resultado negativo por las cuatro técnicas virológicas comerciales usando test rápidos serológicos en dos muestras diferentes de niños mayores de 6 meses de edad. Los test rápidos excluyen la infección y presentan una buena concordancia con los test de amplificación de ácidos nucleicos (Buchanan et al. 2012).

Este estudio es el primero en comparar el rendimiento de 4 técnicas virológicas comerciales en el mismo panel de DBS de niños expuestos al VIH-1. También es el primero en el que se usa kPCR para el diagnóstico precoz infantil con DBS, técnica utilizada anteriormente para la cuantificación de la CV en adultos (Kleshik et al. 2013; Alvarez et al. 2014) y para la evaluación de programas de PTMH (Prieto-Tato et al. 2016). Al usar técnicas virológicas comerciales para el diagnóstico precoz del VIH-1 se esperaría una baja tasa de resultados falsos positivos y falsos negativos. La especificidad del test no depende de la tasa de transmisión materno-infantil, pero a medida que esta tasa se reduce y la prevalencia en niños es menor, aumentará el número de falsos positivos y disminuirá el valor predictivo positivo si la especificidad del test no es del 100% (Feucht et al. 2012; Sutcliffe et al. 2015). Observamos que la tasa de falsos positivos usando el mismo panel de DBS varía según la técnica empleada, con valores que van desde el 0% hasta un 13% al testar una cohorte con una tasa de transmisión vertical del VIH-1 del 2,9% (2/68). Curiosamente, ninguno de los falsos positivos se confirmó en el último DBS recogido usando la misma técnica que los proporcionó. Esto sugiere que el resultado obtenido con la primera muestra era un falso positivo, a pesar de mostrar CV de 400-2.270 cp/ml en el caso de Roche-CV-v2. Puesto que la CV era baja (<550 cp/ml) en 7/10 falsos positivos, se propone precaución a la hora de interpretar resultados con baja CV con técnicas cuantitativas y usando DBS para el diagnóstico precoz infantil. Roche-CV-v2 ha mostrado ciertas limitaciones durante la detección de fracaso terapéutico al TAR usando DBS (detectando ADN proviral y ARN viral), proporcionando valores de CV más altos en

comparación con muestras de plasma (Sawadogo et al. 2014). Ello es, probablemente, debido a que la presencia de ADN interfiere con la exactitud de la cuantificación de ARN viral realizada sobre el DBS (Zida et al. 2016). Un estudio previo mostró una mayor sensibilidad, menor especificidad y valores de viremia más altos en la cuantificación de la CV por Roche-VL-v2 en comparación con kPCR usando el mismo panel de muestras (Alvarez et al. 2015). En los resultados de este capítulo, se obtuvieron 3 falsos positivos con Roche-CV-v2 con CV superiores a 1.000 cp/ml (P5, P6 y P8) que no fueron detectados con kPCR, a pesar de que el límite de detección de este ensayo en DBS es menor (aproximadamente 900 cp/ml) (Kleshik et al. 2013; Alvarez et al. 2014).

El manejo de resultados indeterminados obtenidos mediante técnicas virológicas durante el diagnóstico precoz es un reto importante para los servicios de diagnóstico del VIH-1. En otros países africanos se han reportado falsos positivos usando técnicas moleculares (Patton et al. 2007; Stevens et al. 2008; Lima et al. 2009; Feucht 2012; Kageha et al. 2012; Maritz et al. 2014; Chang et al. 2015; Sutcliffe et al. 2015; Gueye et al. 2016). En Sudáfrica, 40 (5,6%) de los 718 niños que resultaron positivos en un principio usando Amplicor HIV-1 DNA v1.5 Test o Roche-dx-v1 no estaban infectados tras realizar el diagnóstico con test serológicos en muestras longitudinales (Feucht et al. 2012). En Zambia se reportaron dos niños con resultado falso positivo usando técnicas virológicas comerciales (Sutcliffe et al. 2015). En el programa keniano de diagnóstico precoz infantil los resultados indeterminados resultaron ser negativos con más frecuencia que positivos (Kageha et al. 2012). En 3 (1,8%) de 166 niños no infectados se obtuvieron resultados falsos positivos con Roche-dx-v1 mientras que 6 niños que aparentemente eran positivos resultaron ser negativos más adelante (Kageha et al. 2012). Roche-dx-v1 ha mostrado una alta tasa de resultados positivos irreproducibles (25%) en el programa de diagnóstico precoz llevado a cabo en Sudáfrica (Maritz et al. 2014). Las muestras con resultado falso positivo tendían a presentar una pendiente de amplificación baja y un valor de Ct alto que, en conjunto, indican una señal no específica (Maritz et al. 2014; Chang et al. 2015). En otro estudio se sugiere que las señales falsas causadas por artefactos durante la PCR a tiempo real podrían explicar la alta frecuencia de falsos positivos usando técnicas virológicas cuantitativas (Lima et al. 2009). Aunque las guías de la OMS de 2010 y 2014 recomiendan resolver las discrepancias entre un resultado inicial positivo y uno confirmatorio negativo realizando otra prueba con un ensayo de detección de ADN (WHO 2010b; WHO 2014), no mencionan ninguna recomendación sobre el manejo de niños expuestos al VIH con resultados discrepantes empleando técnicas moleculares

diferentes empleando la misma muestra. Los ensayos de diagnóstico precoz disponibles deberían mejorar para alcanzar los valores ideales del 100% de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, estos valores dependen del tipo de muestra empleada y de la técnica *gold standard* de diagnóstico molecular con la que se comparen (Stevens et al. 2008; Smit et al. 2014; Gueye et al. 2016), técnica que no aparece especificada en las guías. Además en ensayos cuantitativos, la sensibilidad y la especificidad pueden variar según el umbral de CV que se considere.

La mayoría de los estudios no utilizan como *gold standard* el diagnóstico definitivo a los 18 meses de edad antes de estimar los valores de sensibilidad y especificidad de las técnicas virológicas comerciales para el diagnóstico precoz infantil. Además, estos valores se pueden ver afectados por la edad del niño, por un manejo inadecuado de las muestras, por contaminaciones o por un mal control de calidad en el laboratorio (Simonds et al. 1998; Gueye et al. 2016). En este trabajo se descartó que los falsos positivos pudieran deberse a contaminaciones durante la toma de muestra y su procesamiento puesto que se emplearon distintos círculos del mismo DBS para realizar las cuatro técnicas virológicas. Además, todos los procedimientos fueron llevados a cabo por especialistas con una amplia experiencia en el manejo de muestras, tanto en Guinea Ecuatorial como en España. De hecho, los ensayos virológicos se realizaron con la asistencia de técnicos especialistas de Roche y Siemens en Madrid. En este trabajo se ha considerado como *gold standard* el diagnóstico definitivo decidido por los pediatras tras la confirmación por técnicas serológicas siguiendo las recomendaciones del protocolo nacional de Guinea Ecuatorial, y no el resultado de una técnica virológica en concreto. Sin embargo, ya que las guías de la OMS recomiendan empezar tratamiento inmediatamente tras el primer resultado positivo por un test molecular (WHO 2016a), los pediatras decidieron que iniciasen el TAR aquellos niños con resultados positivos en las cuatro técnicas virológicas. De hecho, si se hubiese considerado solo la técnica que proporcionó el resultado positivo en la primera muestra, habrían recibido TAR más niños no infectados que infectados. En el caso de algunos niños incluso se habría confirmado el resultado positivo en una segunda muestra con Roche-VL-v2 y Roche-dx-v1, lo cual es preocupante si se tiene en cuenta que en la mayoría de los sitios se analizan las muestras con tan solo una técnica virológica comercial.

El diagnóstico molecular de recién nacidos presenta, además, varios problemas que pueden desembocar en resultados falsos negativos. Las técnicas virológicas comerciales presentan diferentes características sobre todo cuando se usan DBS,

como por ejemplo el volumen de sangre, el tipo de extracción de ácidos nucleicos y el límite de detección. Todo ello afecta a la sensibilidad de la técnica, especialmente cuando la CV es baja (Creek et al. 2008; Smit et al. 2014). La sensibilidad depende de la CV, la cual será más baja en niños que hayan recibido profilaxis durante periodos prolongados o TAR (King et al. 2015), o cuando la integridad del genoma viral se haya visto afectada por un almacenaje incorrecto a malas temperaturas. Estas circunstancias pueden retrasar la detección del ADN proviral y/o el ARN viral o los anticuerpos en los niños, llevando a un mal diagnóstico de los niños infectados (WHO 2014; King et al. 2015). Además, la tasa de positivos puede ser baja cuando se diagnostican infecciones ocurridas en el momento del parto ya que los niveles de replicación son bajos, llegando a estar por debajo del límite de detección de la técnica virológica (Lambert et al. 2003). Por último, la variabilidad viral puede afectar a la detección y amplificación requerida en los ensayos moleculares de diagnóstico viral basados, fundamentalmente, en qPCR, resultando en falsos negativos (Holguín et al. 2008b), aunque en este estudio las cuatro técnicas detectaron los subtipos no-B causantes de la infección de los dos niños infectados.

En este trabajo no se encontró ningún falso negativo en toda la cohorte pediátrica de estudio. Los DBS se mantuvieron bien conservados hasta su uso y las 4 técnicas virológicas empleadas amplificaron tanto ADN proviral como ARN viral, detectando 3 regiones diferentes (LTR, gag, IN) del genoma del VIH-1 entre todas las técnicas utilizadas. Ninguno de los niños había recibido TAR durante un tiempo prolongado antes de la toma de muestra. La profilaxis y la primera exposición a TAR en el útero en los dos niños infectados no afectaron a la detección del virus, ni en la primera muestra ni en muestras longitudinales, mostrando ambos una alta CV. Ello, probablemente, pudo deberse a la corta duración de la profilaxis y el poco tiempo que transcurrió entre la prescripción del TAR y la toma de la muestra longitudinal. Desafortunadamente, no pudimos comparar la sensibilidad y la especificidad de las 4 técnicas virológicas comerciales debido al limitado número de pacientes incluidos en el programa. Fue imposible recoger muestras longitudinales de todos los niños con resultados discrepantes debido a la pérdida de seguimiento. Además, aunque el algoritmo de diagnóstico precoz infantil de la OMS considera como no infectado a aquellos niños con un resultado negativo por una técnica virológica en la primera muestra recogida a las 4-6 semanas de edad si nunca ha recibido lactancia materna (WHO 2014), sería necesario mejorar la retención de los pacientes hasta los 9 y 18 meses de edad, lo cual no fue posible en la mayoría de los pacientes.

En conclusión, las técnicas virológicas comerciales han sido de gran utilidad para el diagnóstico precoz infantil del VIH-1 usando DBS en países de recursos limitados. Aun así, es crucial aumentar la especificidad de estos ensayos para reducir el número de falsos positivos, lo cual puede desencadenar un diagnóstico erróneo, el inicio de un TAR innecesario y una estimación incorrecta de la tasa de transmisión vertical, siendo esto esencial para una correcta evaluación de los programas PTMH. Este trabajo no pretende señalar ninguna técnica como *gold standard*, sino mostrar que algunos ensayos que se han considerado fiables previamente pueden proporcionar falsos positivos durante el diagnóstico precoz infantil del VIH-1, dependiendo la tasa de falsos positivos de la técnica empleada. Estos resultados refuerzan la necesidad de más estudios que comparen diferentes técnicas virológicas comerciales en el mismo panel de muestras. Además, también se necesitan guías con recomendaciones más claras sobre el manejo de niños expuestos al VIH-1 con resultados discrepantes para mejorar su diagnóstico.

El trabajo descrito en este capítulo ha sido publicado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Álvarez P, Martín L, Prieto L, Obiang J, Avedillo P, Vargas A, Rojo P, Fernández McPhee C, Sanz Canalejas L, Benito A, Ramos JT y Holguín A. *Evaluation of four commercial virological assays for early infant HIV-1 diagnosis using dried blood specimens*. Pediatric Research 2016 (en prensa). Índice de impacto: 2,76, cuartil 1.

CAPÍTULO 4

Variantes del VIH-1 y mutaciones de resistencia en mujeres embarazadas de Bata (Guinea Ecuatorial): 2012-2013

ANTECEDENTES

El VIH/sida sigue siendo una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad en Guinea Ecuatorial, siendo la ruta de transmisión más común la heterosexual, seguida por la transmisión vertical de madres a hijos y las transfusiones (UNAIDS 2014). Como se ha dicho en la **Introducción** de la **Tesis**, en la última década, la prevalencia del VIH ha aumentado en mujeres embarazadas en Guinea Ecuatorial (1,5% en 1997 y 10,1% en 2013) (UNAIDS 2014). También ha aumentado el porcentaje de mujeres que han recibido TAR para prevenir la transmisión vertical del VIH-1 del 30,2% en 2012 al 78,6% en 2013, más alto que en la población general del país (28,4% en adultos y 6,3% en población pediátrica en 2013) (UNAIDS 2014). Por ello, la monitorización de la resistencia a ARV es especialmente importante en la población de mujeres embarazadas ya que la infección por virus resistentes puede influir en el diseño del TAR maternal y en de la profilaxis neonatal. Sin embargo, en Guinea Ecuatorial no se ha implementado aún los análisis genotípicos de resistencias de forma rutinaria en pacientes infectados. Por ello, el principal objetivo de este estudio fue describir y cuantificar por primera vez en el país, la presencia de MRA o de mutaciones de transmitidas (MRT) y las variantes del VIH-1 en mujeres embarazadas que participaban en un programa PTMH en el Hospital Regional y el Centro de Atención Primaria María Rafols en Bata, Guinea Ecuatorial, durante el periodo 2012-2013.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y toma de muestra

Se recogieron DBS de 69 mujeres embarazadas que participaron en un cribado voluntario durante el programa de PTMH, ya establecido en 2008, llevado a cabo en el Hospital Regional de Bata y el Centro de Atención Primaria María Rafols en Bata, Guinea Ecuatorial, desde noviembre de 2012 hasta diciembre de 2013. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado escrito y el estudio fue aprobado por los comités éticos del Hospital Regional de Bata (Bata, Guinea Ecuatorial) y del Hospital Universitario de Getafe (Madrid, España). Las muestras se tomaron mediante venopunción en el momento cercano al parto, recogiendo dos gotas de sangre en cada círculo de una tarjeta Whatman 903 (aproximadamente 70 µl de sangre). Los DBS se dejaron secar a temperatura ambiente durante una noche en el hospital. De cada paciente se recogieron dos tarjetas, guardadas en una bolsa de plástico con cierre hermético con bolsas desecantes. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su transporte en hielo seco hasta Madrid, España, donde se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Secuenciación del VIH para la identificación de la variante y el análisis de mutaciones de resistencia

La extracción de ARN a partir de DBS se realizó mediante la plataforma automática NucliSENS easyMAG (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). A continuación, se amplificó el ARN mediante una RT-PCR casera y nested-PCR para obtener el gen completo de la PR (codones 1-99) y el gen parcial de la TI (codones 1-335) como se ha descrito previamente (Holguín et al. 2013b). Los amplicones se purificaron con *ExoProStar* (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) y secuenciados por MacroGen.

La prevalencia de MRT se definió según la lista de mutaciones para vigilancia de la transmisión de resistencias que recomienda la OMS (Bennett et al. 2009) desglosada en el **Anexo II**. Para su identificación se utilizó la herramienta CPR (*Calibrated Population Resistance*), disponible en internet (**Anexo I**). Para identificar las MDR se usaron las secuencias *pol* de pacientes expuestos a TAR considerando las sustituciones marcadas en la lista de mutaciones de 2015 de la AIDS Society-USA (IAS-USA) (Wensing et al. 2015). La interpretación genotípica de esas mutaciones de resistencia se evaluó usando el algoritmo HIVdb de la Universidad de Stanford (Palo Alto, California, EE. UU.) versión 6.0.11 (**Anexo I**). Según dicho algoritmo, se clasificó la resistencia predicha en tres categorías según la puntuación o *score*: sensible, intermedia y resistente.

Mediante análisis filogenético de las secuencias *pol* se identificaron los subtipos y CRF del VIH-1. Para ello se utilizó como referencia la versión 2015 del alineamiento de subtipos de referencia del Laboratorio Nacional de Los Álamos, EE. UU. disponible en internet (**Anexo I**). Las referencias incluían al menos dos secuencias representativas de cada uno de los 9 subtipos y los 66 CRF del grupo M del VIH-1 disponibles en el momento del análisis, utilizando como raíz la secuencia YBF30 del grupo N. Además se añadieron secuencias adicionales de variantes circulantes descritas en Guinea Ecuatorial (Yebra et al. 2013a). Estas secuencias se alinearon utilizando el programa ClustalX versión 2.0.11 (**Anexo I**) y los árboles filogenéticos se generaron con el paquete informático PHYLIP (**Anexo I**). La topología de dichos árboles se obtuvo con el método de *neighbour-joining*, estimando la matriz de distancias entre pares utilizando el modelo de dos parámetros de Kimura como modelo de sustitución nucleotídica. Para medir la robustez de los árboles se llevó a cabo un remuestreo o *bootstrap* con 1.000 repeticiones, estableciendo el límite en el que se considera como

fiable un agrupamiento en 700 (Hillis & Bull 1993). Las secuencias no identificadas como ningún subtipo o CRF se consideraron URFs.

Números de acceso

Las secuencias obtenidas para el subtipaje y la identificación de mutaciones de resistencia se depositaron en la base de datos GenBank (**Anexo I**) con los números de acceso KP890858-KP890927.

Cuantificación de la carga viral

Para cuantificar la CV plasmática del VIH-1 a partir de DBS se utilizó el ensayo kPCR de Siemens. Para ello se eluyó un círculo del DBS en 2 ml de buffer de lisis específico para DBS con tiocianato de guanidina. El DBS se incubó en dicho buffer a temperatura ambiente durante 30 m con una rotación suave. A continuación, se procesó 1,1 ml del sobrenadante con el módulo de preparación de muestra del sistema VERSANT kPCR. Para procesar la muestra se utilizaron los parámetros del software preestablecidos sin modificación alguna. El límite de detección de este ensayo para DBS es de 894 cp/ml (Alvarez et al. 2014). Puesto que se desconocía el valor del hematocrito de cada paciente, se asumió un valor medio de 31,7% (Mwinga et al. 2009) para realizar la corrección como se ha descrito en el **Capítulo 1**.

Análisis estadístico

Para el análisis de tablas de contingencia comparando el número de pacientes con infección por distintos subtipo entre este estudio y trabajos anteriores se realizó una prueba Chi-cuadrado utilizando el programa SPSS versión 13. Se estableció el límite de significación en 0,05 para los valores *p*. La prevalencia se expresó en forma de porcentaje.

RESULTADOS

Características epidemiológicas y virológicas de la población de estudio

Las 69 mujeres embarazadas incluidas en el estudio tenían una mediana de edad de 22 años (RIQ: 20-25), todas se infectaron por vía heterosexual y la mitad eran asintomáticas (el 50,7% se encontraban en el estadio clínico I de la OMS) (**Tabla 4.1**). De las 69 mujeres, 12 (17,4%) eran *naïve* para las tres familias de ARV en el momento de la toma de muestra, 55 (79,7%) estaban recibiendo TAR y en 2 (2,9%) casos el TAR era desconocido. De esas 55 mujeres tratadas, 21 habían recibido monoterapia con AZT mientras que 34 recibieron TARGA como régimen de primera línea. Fue

posible amplificar una región parcial del gen *pol* de 38 (55,1%) de las 69 mujeres del estudio (**Tabla 4.1**).

De las 38 mujeres con secuencia *pol* disponible (34 con secuencia PR y 28 con secuencia TI casi completa), 30 (78,9%) estaban recibiendo TAR. Las 8 (21,1%) mujeres restantes eran *naïve* para las tres familias de ARV (**Tabla 4.1**). Sin embargo, al analizar las familias por separado, 8 de las 38 eran *naïve* para ITIAN, 25 para ITINAN y 33 para IP. Las mujeres *naïve* no habían estado expuestas anteriormente a TAR ya que no habían recibido tratamiento previamente o ningún tipo de cuidado prenatal según los historiales clínicos de Guinea Ecuatorial. En el **Anexo IV** se citan las principales características clínicas y virológicas de las 69 mujeres del estudio, incluyendo el tipo de parto, la CV, la variante del VIH-1, el TAR y las MDR. De las 69 mujeres de la cohorte, 35 (50,7%) tenían CV >1.000 cp/ml (valor considerado por la OMS como CV detectable cuando se usan DBS), 13 (18,8%) tenían CV <1.000 cp/ml y en 21 (30,4%) casos no se detectó el virus. En 3 (8,6%) de los 35 pacientes con CV >1.000 cp/ml no fue posible amplificar el genoma viral para obtener la secuencia.

Teniendo en cuenta a las 55 mujeres tratadas, 28 (50,9%) tenían CV <1.000 cp/ml y 27 (47,9%) tenían CV >1.000 cp/ml. La alta CV encontrada en 19 (76%) mujeres tratadas sin MDR podría apuntar a una adherencia subóptima o a una dosis no adecuada del TAR, entre otros. Desafortunadamente, no fue posible obtener información sobre la adherencia al TAR. De los 31 pacientes sin secuencia disponible, 10 tenían CV <1.000 cp/ml, en 18 casos no se detectó el virus y tan solo 3 mujeres tenían CV >1.000 cp/ml (rango: 1.065-2.016 cp/ml). A pesar de que la mayoría (66,7%) de las 12 mujeres *naïve* presentaron viremia detectable, como era de esperar en ausencia de TAR, 3 (25%) de ellas tuvieron CV <1.000 cp/ml y 1 (8,3%) presentó CV indetectable. Entre las 38 mujeres con secuencia disponible, 32 (84,2%) tenían CV >1.000 cp/ml.

En el **Anexo V** se muestran todas las MDR de las 38 mujeres con secuencia PR y/o TI disponible. Quince (50%) de las 30 mujeres en TAR habían estado expuestas a ITIAN, principalmente monoterapia con AZT. Las otras 15 mujeres habían recibido TARGA como primer régimen, basado en triple terapia con dos ITIAN (FTC, TDF, AZT o 3TC) y un ITINAN (EFV o NVP) o un IP (LPV/r). Por lo tanto, entre las 38 mujeres con secuencia *pol* disponible, 9 eran *naïve* a ITIAN, 24 a ITINAN y 29 a IP (**Tabla 4.1**). Entre las 30 pacientes expuestas a TAR con secuencia *pol*, 25 (83,3%) presentaron

CV >1.000 cp/ml en el momento de la recogida de muestra (mediana: 2.405 cp/ml; rango: 1.192-178.025).

Tabla 4.1. Características epidemiológicas y virológicas de la población de estudio.

Características	Cohorte	Con secuencia PR y/o RT disponible
Núm. de mujeres infectadas	69	38
Vía de transmisión heterosexual	69 (100%)	38 (100%)
Estadio clínico (OMS)		
I	35 (50,7%)	19 (50%)
II	2 (2,9%)	1 (2,6%)
III	1 (1,4%)	0
IV	0	0
Desconocido	31 (44,9%)	18 (47,4%)
Parto vaginal	55 (79,9%)	30 (78,9%)
Transmisión vertical de VIH-1	2 (2,9%)	2 (5,3%)
Tratamiento		
Naïve para las 3 familias	12 (17,4%)	8 (21,1%)
Tratadas	55 (79,7%)	30 (78,9%)
Desconocido	2 (2,9%)	0
Con mutaciones de resistencia	-	8 (21,1%)
Variantes del VIH-1		
Subtipo B	-	1 (2,6%)
Subtipo no-B	-	37 (97,4%)
Recombinantes	-	29 (76,3%)

Núm., número; OMS, Organización Mundial de la Salud. Entre las 38 pacientes con secuencia *pol* parcial disponible, 34 tenían secuencia de la PR y 28 de la TI.

En cuanto al análisis de mutaciones de resistencia, no se encontraron MDR en las 12 mujeres *naïve* para las 3 familias de ARV. Considerando cada familia, no se encontraron MRT en mujeres *naïve* a ITIAN o ITINAN, pero la tasa de MRT a IP fue del 3,4% (1/29), puesto que se identificó la mutación D30N en la PR en una paciente que no había recibido tratamiento con IP infectada por la variante CRF02_AG. La tasa de MRA fue del 37,5% para pacientes expuestos a ITINAN y del 8,7% a ITIAN, no encontrándose mutaciones de resistencia en pacientes que hubiesen recibido tratamiento con IP. En ningún caso se encontró doble resistencia a ITIAN e ITINAN. Al considerar los 25 pacientes en TAR con CV >1.000 cp/ml y secuencia disponible, 6 (24%) presentaron MRA. En la **Tabla 4.2** se muestra la tasa de mutaciones de resistencia y dichos cambios en las 9 pacientes infectadas por variantes resistentes. En la cohorte del estudio, sólo hubo 2 casos de transmisión vertical, con una tasa del 2,9%, menor que en años anteriores (Badillo-Navarro et al. 2014). Ninguna de estas 9 mujeres infectadas por virus con mutaciones de resistencia transmitió la infección a su hijo.

Tabla 4.2. Características epidemiológicas y virológicas de las 8 mujeres infectadas por virus resistentes.

Paciente	TAR	Familia antirretroviral			CV (log ₁₀)	Variante VIH-1	Mutaciones de resistencia			Nivel de resistencia potencial predicho y antirretroviral afectado ¹		
		ITIAN	ITINAN	IP			IP (en PR)	ITIAN (en TI)	ITINAN (en TI)	Alta	Moderada	Baja
GM74	Monoterapia	AZT	-	-	ND	CRF02_AG	D30N*	NA	NA	NFV	-	-
GM37	Monoterapia	AZT	-	-	5,9	CRF02_AG	-	M41L	-	-	-	AZT, d4T, DDI
GM62	Monoterapia	AZT	-	-	5,1	CRF02_AG	-	-	V90I*	-	-	-
GM6	TARGA	AZT, 3TC	-	LPV/r	5,4	CRF02_AG	-	-	V90I*	-	-	-
GM38	TARGA	TDF, FTC	EFV	-	4,9	CRF02_AG	-	M184V	-	FTC,3TC	-	DDI, ABC
GM9	TARGA	AZT, 3TC, FTC/TDF	NVP, EFV	LPV/r	4,5	Sub-subtipo A3	-	-	V106I	-	-	-
GM42	TARGA	TDF, FTC	EFV	-	3,6	Subtipo C	NA	-	V179D, G190A	NVP	EFV	ETR, RPV
GM34	TARGA	TDF, FTC	EFV	-	5,9	CRF02_AG	-	-	E138A	-	-	ETR, RPV
GM2	naive	-	-	-	2,9	CRF02_AG	-	-	V90I*	-	-	-

TAR, terapia antirretroviral; CV, carga viral; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleosido: AZT, zidovudina; d4T, estavudina; DDI, didanosina; ABC, abacavir; FTC, emtricitabina; 3TC, lamivudina; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleosido: NVP, nevirapina; EFV, efavirenz; ETR, etravirina; RPV, rilpivirina; IP, inhibidores de la proteasa: NFV, nelfinavir; TARGA, tratamiento antirretroviral de gran actividad; NA, dato no disponible; ND, no detectado (<894 cp/ml según Alvarez et al. 2014); guión, ausencia de mutación o resistencia potencial.

*Mutación considerada como Resistencia transmitida.

¹Según el algoritmo HIVdb de Stanford.

Respecto a las variantes del VIH-1 circulantes en la población de mujeres embarazadas, se observó una epidemiología molecular compleja, similar a la descrita previamente en otros estudios realizados en población inmigrante en España (Yebra et al. 2013a). La mayoría (97,4%) de las infecciones fueron causadas por variantes no-B del grupo M, principalmente (78,9%) formas recombinantes (**Tabla 4.3**). La variante CRF02_AG causó más de la mitad (55,2%) de las infecciones, seguida por CRF22_A101 (10,5%), subtipo C (10,5%), URF (5,3%) y un 2,6% de cada una de las siguientes variantes: sub-subtipos A3 y F2, subtipos B, D y G y los recombinantes CRF06_cpx y CRF11_cpx. En comparación con los estudios publicados previamente sobre la epidemiología del virus durante 1997-2001 (Ortiz et al. 2001; Djoko et al. 2010; Yebra et al. 2013a) se encontró un aumento de las infecciones causadas por variantes recombinantes.

Tabla 4.3. Variantes del VIH-1 del grupo M descritas en pacientes de Guinea Ecuatorial durante 1997-2013.

Variante VIH-1	Yebra et al., 2013 ¹	Este trabajo	(p-valor)
Año de muestreo	1997-2011	2012-2013	
Núm. de pacientes	278	38	
Colectivo infectado	Población general	Mujeres embarazadas	
Gen secuenciado	<i>pol</i>	<i>pol</i>	
Método de subtipaje	phy	phy	
Subtipos puros	122 (43,9%)	9 (23,7%)	<0,05
A	38 (13,7%)	1 A3 (2,6%)	NS
B	20 (7,2%)	1 (2,6%)	NS
C	16 (5,7%)	4 (10,5%)	NS
D	14 (5,0%)	1 (2,6%)	NS
F	11 (4,0%)	1 F2 (2,6%)	NS
G	15 (5,4%)	1 (2,6%)	NS
H	8 (2,9%)	0	NS
Recombinants	156 (56,1%)	29 (76,3%)	<0.05
CRF02_AG	133 (47,8%)	21 (55,2%)	NS
CRF06_cpx	4 (1,4%)	1 (2,6%)	NS
CRF09_cpx	1 (0,4%)	0	NS
CRF11_cpx	7 (2,5%)	1 (2,6%)	NS
CRF13_cpx	3 (1,1%)	0	NS
CRF18_cpx	1 (0,4%)	0	NS
CRF22_01A1	3 (1,1%)	4 (10,5%)	<0.05
URF	4 (1,4%)	2 (5,3%)	NS

CRF, forma recombinante circulante; URF, forma recombinante única; phy, análisis filogenético de secuencias VIH-1 (*pol* o *env*); NS, no significativo ($p > 0.05$). ¹Según Yebra, de Mulder, et al. 2013. Este estudio analiza secuencias *pol* de 195 pacientes ecuatoguineanos infectados por VIH atendidos en España durante 1997-2011 y 86

secuencias de GenBank obtenidas de Guinea Ecuatorial durante 1997 y 2008 de personal militar de Malabo y población general infectada.

DISCUSIÓN

Las guías de la OMS publicadas en 2016 recomiendan tratar de por vida a todos los pacientes infectados por VIH-1, independientemente del recuento de linfocitos T CD4. Sin embargo, la monitorización de resistencias se considera un reto para controlar la epidemia por VIH (WHO 2016b). Tratar a todas las mujeres embarazadas o lactantes cumple tres propósitos: mejorar la salud de la madre, evitar la transmisión vertical del virus y evitar la transmisión a la pareja (WHO 2016a). El posible daño de ofrecer tratamiento a largo plazo incluye la acumulación de toxicidad causada por los ARV y la posibilidad de la pérdida de adherencia, lo cual conduciría al desarrollo de MDR, las cuales deberían ser monitorizadas periódicamente. La identificación de MDR es crucial para publicar guías de TAR de primera línea y de rescate a nivel nacional (Rhee et al. 2015; WHO 2016b). Durante los últimos años se han hecho estudios de MDR en mujeres embarazadas de países de América Latina (da Costa et al. 2013; Cecchini et al. 2014; de Lourdes Teixeira et al. 2015; Lima et al. 2016), El Caribe (Amarakoon et al. 2014) y África subsahariana (Somi et al. 2008; Bonney et al. 2013; Kiptoo et al. 2013; Vairo et al. 2013; Imade et al. 2014; Bruzzzone et al. 2015; Hauser et al. 2015; Palombi et al. 2015; Sagna et al. 2015). En 2012, las guías nacionales de Guinea Ecuatorial sobre los programas de PTMH recomendaban profilaxis con AZT o TARGA, dependiendo del recuento de linfocitos T CD4 y el estadio clínico de la OMS (opción A), a todas las mujeres embarazadas (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social 2009). Sin embargo, a pesar del mayor acceso a TAR (74% en 2014) (http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2015/november/20151127_equatorialguinea), Guinea Ecuatorial aún carece de estudios sistemáticos de vigilancia para monitorizar la resistencia a fármacos en la población general, incluyendo a mujeres embarazadas, lo cual podría tener un impacto sobre la transmisión vertical de variantes resistentes del VIH-1.

En países de bajos recursos el margen de éxito del TAR a largo plazo es estrecho porque las terapias basadas en ITINAN tienen una baja barrera genética a la resistencia. De hecho, el fracaso al TAR con una dosis fijada de una combinación de ITIAN/ITINAN ocurre entre el 10-30% de los pacientes cada año (Barth et al. 2010; McMahon et al. 2013; Aghokeng et al. 2014) y la mayoría de pacientes con fracaso virológico adquiere resistencia a ITIAN o ITINAN (WHO 2012a; Stadeli & Richman

2013; Aghokeng et al. 2014). En Guinea Ecuatorial, la terapia de primera línea incluye dos ITIAN y un ITINAN, obteniéndose así una buena respuesta con la adherencia adecuada. Sin embargo, si la mujer embarazada ha recibido ITINAN previamente de forma no continuada, existe el riesgo de selección de resistencias a ITINAN. Dentro de la cohorte de mujeres embarazadas de Guinea Ecuatorial se observó una alta tasa de resistencia a ITINAN, probablemente debido a la inclusión de NVP y EFV en la mayoría de regímenes de PTMH. La selección de resistencia a ITINAN en pacientes con TARGA podría verse favorecida por la baja barrera genética de esta familia de ARV y por una baja adherencia. En cuanto a los ITIAN, la selección de MDR a AZT en mujeres embarazadas con viremia baja y que están recibiendo monoterapia con AZT durante el embarazo no es frecuente (Larbalestier et al. 2003), tal y como se ha visto en este trabajo. Puesto que no se encontraron MRA a IP en la población tratada, los IP podrían ser buenos candidatos para ser incluidos en regímenes de rescate en Guinea Ecuatorial. Se observó una baja prevalencia de MRT en la cohorte, con tan solo una mujer *naïve* infectada por un virus resistente, posiblemente transmitido por su pareja sexual. Sin embargo, la tasa de MRT podría ser mayor debido a las interrupciones del TAR y otros factores atenuantes que afectan negativamente a la adherencia en Guinea Ecuatorial y otros países de recursos limitados (Gourlay et al. 2013). Esta MRT podría ser seleccionada (o extinguida) por la futura exposición a ARV.

La población estudiada representaba cerca del 7% de las mujeres embarazadas infectadas por VIH del país en el periodo de estudio y el 100% de las asistentes al programa de PTMH en Bata (Ministerio de Sanidad y Bienestar Social; Ministerio de Economía Planificación e Inversiones Públicas e ICF International; República de Guinea Ecuatorial 2012). Se observó que el 17,4% de ellas eran *naïve* para ITIAN, ITINAN e IP, a pesar de haber sido incluidas en un programa de PTMH. Además, la mitad de las 55 mujeres en TAR presentaban viremia detectable en el momento de toma de muestra, lo cual sugiere una baja adherencia al TAR. La baja adherencia en mujeres embarazadas es un problema importante en África subsahariana, ya que predice el fracaso virológico, la emergencia de virus resistentes, la progresión a enfermedad y la muerte (WHO 2016b). Problemas del sistema de salud (como la dotación del personal y la accesibilidad a los servicios), factores educativos (poco conocimiento sobre el VIH, el sida y/o la transmisión vertical junto con un nivel educativo bajo) y factores a nivel de comunidad (estigma, trastornos psicosociales, miedo a revelar el estado de infección y la falta de apoyo por parte de la pareja o el entorno) aún dificultan el acceso al TAR y podrían explicar la falta de toma de ARV por parte de estas mujeres, como se ha publicado anteriormente (Gourlay et al. 2013).

Este trabajo destaca la importancia de reforzar el programa de PTMH en Bata para que todas las participantes reciban TAR antes del parto, evitando pérdidas de seguimiento desde el diagnóstico de VIH hasta el inicio del TAR. Los resultados obtenidos proporcionan información reciente sobre la epidemiología molecular del VIH-1 en Guinea Ecuatorial. Se confirmó la predominancia de las variantes recombinantes, causando CRF02_AG cerca del 55% de las infecciones. Además, se observó un aumento de las infecciones causadas por URF comparado con estudios realizados en años anteriores. El proceso de recombinación del VIH-1 es una fuerza evolutiva potente que ocurre 10 veces más frecuentemente que las mutaciones puntuales y genera y mantiene la variabilidad al combinar y arrastrar material genético viral. La evolución continua y la diversificación del VIH-1 plantea nuevos retos para la prevención, su tratamiento y la monitorización usando técnicas moleculares (Moutouh et al. 1996; Ramirez et al. 2008; Zhang et al. 2010; Moradigaravand et al. 2014). Puesto que no se analizó el genoma viral completo en este trabajo, la tasa de recombinantes podría haber sido aún mayor si se hubieran secuenciado más regiones.

Este trabajo presenta algunas limitaciones. El tamaño de muestra del programa de PTMH llevado a cabo en Guinea Ecuatorial era pequeño, incluyendo tan solo 69 mujeres embarazadas en el estudio. La información acerca de embarazos previos no estaba disponible en la clínica, pero es poco probable que estas mujeres hubiesen estado expuestas a TAR antes de participar en el programa de PTMH. Ya que la mayoría de las mujeres incluidas estaban recibiendo TAR en el momento de la toma de muestra, con lo cual la CV era baja, solo fue posible obtener información de 38 pacientes, representando el 55,1% de toda la cohorte, una alta tasa si se compara con otros estudios llevados a cabo en mujeres embarazadas (Cecchini et al. 2014; Palombi et al. 2015; Sagna et al. 2015). Siguiendo las recomendaciones de la OMS para la identificación de resistencias en zonas de recursos limitados, se utilizaron DBS para obtener la secuencia, mientras que el resto de estudios sobre mujeres embarazadas, exceptuando el que se llevó a cabo en Tanzania (Somi et al. 2008), utilizaron mayores volúmenes de plasma o sangre completa (da Costa et al. 2013; Amarakoon et al. 2014; Cecchini et al. 2014; de Lourdes Teixeira et al. 2015; Lima et al. 2016). A pesar de que los DBS se recogieron durante 2012-2013, la información proporcionada sobre la epidemiología molecular y los datos de resistencia son los primeros que se aportan acerca del colectivo de mujeres embarazadas en Guinea Ecuatorial, siendo esta una información valiosa tanto para el personal clínico como para las autoridades del Sistema Nacional de Salud del país. La relevancia de este trabajo radica en la importancia que tiene una correcta monitorización del TAR en Bata y Malabo, las dos

ciudades principales del país, ya que podría reducir la infección por VIH en Guinea Ecuatorial

(http://www.unaids.org/es/resources/presscentre/featurestories/2015/november/20151127_equatorialguinea). Puesto que la población de Bata presenta una menor tasa de infección en mujeres embarazadas respecto a la población de la región insular (UNAIDS 2014) y que la población urbana en Bata presenta amplias diferencias respecto al área rural de Guinea Ecuatorial en términos de tasa de fertilidad y acceso a servicios de PTMH, deberían reforzarse los estudios de resistencias en esta población clave.

En conclusión, la baja presencia de MDR a IP en mujeres embarazadas *naïve* y la alta tasa de resistencia a inhibidores de la TI (principalmente a ITINAN) observada en mujeres pretratadas, destaca la importancia de la monitorización sistemática de MDR a fármacos en mujeres embarazadas de Guinea Ecuatorial. Así se podría reducir la transmisión de variantes resistentes a los recién nacidos o a las parejas, optimizar el TAR cuando se hayan identificado MDR y preservar futuras opciones de TAR. Tanto el asesoramiento para mejorar la adherencia como la monitorización periódica de la respuesta virológica son cruciales para una implementación exitosa del TAR en mujeres embarazadas durante los programas PMTH.

El trabajo descrito en este capítulo ha sido publicado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Álvarez P, Fernández McPhee C, Prieto L, Martín L, Obiang J, Avedillo P, Vargas A, Rojo P, Benito A, Ramos JT y Holguín A. *HIV-1 Variants and Drug Resistance in Pregnant Women from Bata (Equatorial Guinea): 2012-2013*. PLoS ONE 2016 (en prensa). Índice de impacto: 3,057, cuartil 1.

DISCUSIÓN INTEGRADORA |

El uso de muestras de sangre seca está cada vez más extendido en países de recursos limitados para el diagnóstico molecular precoz del VIH-1 en niños menores de 18 meses y para la monitorización de la infección, incluyendo la cuantificación de la viremia para evaluar la capacidad de supresión viral del TAR y la detección de virus resistentes para identificar precozmente fracasos terapéuticos. Por otro lado, poco se conoce acerca del efecto de la diversidad viral en la eficacia de técnicas moleculares empleadas en el diagnóstico y la cuantificación del VIH y son pocos estudios los que han comparado distintas técnicas virológicas comerciales en paneles de muestras de pacientes infectados por distintos subtipos y recombinantes del VIH-1. En esta **Tesis** se presentan datos sobre la eficacia de varias técnicas moleculares en uso clínico para cuantificación del VIH, mostrando por primera vez una subestimación media de $0,8 \log_{10}$ en la cuantificación de la CV por kPCR de Siemens al usar 70 μ l de sangre seca en vez de plasma. Así, se ha observado una alta correlación de la cuantificación del VIH-1 por kPCR en plasma y DBS, especialmente en muestras con más de 1000 cp/ml. Por otro lado, se ha encontrado que kPCR sobreestima la CV en el subtipo G y el CRF02_AG, lo cual destaca la importancia de identificar la variante del VIH durante la monitorización de la infección. Ya que cada vez es mayor el número de variantes no-B y recombinantes complejos en la pandemia, y que son mayoritarios en los países con mayores tasa de infección, estas técnicas deberían ser validadas para estas variantes, ya que podrían conllevar una sub- o sobreestimación de la viremia en las muestras ensayadas, propiciadas probablemente por el efecto de la variabilidad genética del virus. Por ello, es necesario incrementar la sensibilidad y la especificidad de los ensayos de cuantificación de la CV puesto que las sobreestimaciones podrían interpretarse como eventos de fallo virológico y las subestimaciones como un falso control de la viremia o falsos negativos. Por lo tanto, sería recomendable usar siempre la misma técnica de CV para monitorizar la infección por VIH-1 durante el seguimiento clínico del paciente. Algo similar ocurre con el diagnóstico precoz en niños expuestos al VIH-1. La baja especificidad encontrada en determinados ensayos comerciales se refleja en un elevado número de falsos positivos, lo cual podría desencadenar un diagnóstico erróneo con el subsecuente inicio de un TAR innecesario y una estimación de la tasa de transmisión vertical del VIH errónea, lo que podría afectar a la valoración de la eficacia de los programas de PTMH.

Ya que hasta el momento es imposible la erradicación del VIH, el objetivo del TAR es suprimir al máximo la replicación del virus. Sin embargo, una mala adherencia puede provocar la aparición de MRA que disminuyen la eficacia del tratamiento. Teniendo esto en cuenta, es importante realizar estudios sistemáticos de vigilancia

para monitorizar la resistencia a ARV transmitida y adquirida y ajustar así el tratamiento frente a la infección por VIH-1 de primera línea y de rescate tras los fracasos terapéuticos. En esta **Tesis** se han identificado por primera vez las MDR en una cohorte de mujeres embarazadas de Bata (Guinea Ecuatorial) que participaron en un programa de PTMH. Dentro de esta cohorte se observó una alta tasa de resistencia a ITINAN, probablemente debido a que la mayoría de los regímenes de PTMH incluyen NVP y EFV. La baja barrera genética de esta familia de ARV, junto con una baja adherencia al TAR, podría favorecer la selección de resistencias en pacientes con TARGA. El uso de TAR con una alta barrera genética a la resistencia, incluyendo nuevas familias de fármacos, en combinación con una mejor adherencia por parte del paciente podría reducir las tasas de MRA al disminuir la generación de nuevas cepas resistentes. Sin embargo, el escaso acceso a nuevos fármacos y los altos precios que estos tienen dificultan su uso en países con una alta prevalencia de VIH-1. Los datos presentados de las resistencias en mujeres embarazadas y del diagnóstico precoz en sus hijos menores de 18 meses usando técnicas moleculares son pioneros en el país, ya que no existen precedentes en este colectivo y no están implantadas las técnicas virológicas para el seguimiento de la infección. Aunque la Organización Mundial de la Salud va a poner en marcha un plan global para combatir las resistencias durante el 2017-2021 a nivel global sólo incluirá estudios en población pediátrica infectada a partir del 2020. Sin embargo, Guinea Ecuatorial no está incluido entre los 34 países seleccionados donde se harán los estudios, al igual que otros países con altas prevalencias de VIH en niños.

En esta **Tesis** se ha demostrado que las muestras de sangre seca o DBS mejoran el acceso a pruebas moleculares de detección y cuantificación del VIH-1, especialmente en zonas donde la infraestructura para la toma, almacenamiento o transporte de muestras infectadas a laboratorios especializados es difícil o cuando el volumen disponible de sangre es muy pequeño. Ello permite realizar un diagnóstico precoz del VIH-1 en niños de madres expuestas, la monitorización de la infección mediante la cuantificación de la carga viral, y la identificación de las mutaciones de resistencia y de la variante viral. Sin embargo, los resultados mostrados en esta **Tesis** refuerzan la necesidad de evaluar la eficacia de detección y/o cuantificación del VIH-1 por cada técnica virológica en DBS para compararla con los valores proporcionados en plasma, así como la importancia de estudiar su capacidad de detección en muestras infectadas por distintos subtipos y recombinantes del VIH-1, antes de implantarla en los países donde multitud de variantes diferentes circulan y las variantes no-B del VIH-1 son prevalentes.

CONCLUSIONES |

1. Las muestras de sangre seca han demostrado su utilidad para aumentar el acceso al diagnóstico molecular precoz y a la monitorización de la infección por VIH-1, incluyendo la cuantificación de la viremia, la detección de la variante del VIH-1 y la identificación de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales para una detección precoz de los fracasos terapéuticos, especialmente en regiones con recursos limitados.
2. Al comparar los valores de CV en DBS con los obtenidos en muestras de plasma usando la técnica cuantitativa kPCR de Siemens es necesario realizar una corrección teniendo en cuenta el volumen de plasma del círculo del DBS empleado para la cuantificación que depende, principalmente, del hematocrito del paciente.
3. En general, tras cuantificar con kPCR la CV en muestras pareadas de 1,5 ml de plasma y 70 µl de sangre seca en un círculo del DBS se ha observado una subestimación media de la CV en DBS de 0,8 log₁₀, conduciendo a una estimación errónea de supresión viral, siendo mayor en variantes CRF02_AG y subtipo G. A pesar de ello, en muestras con baja CV (<1.000 cp/ml en plasma), el DBS puede contener suficientes niveles de ADN proviral y ADN no integrado que puede llevar a una sobreestimación de la CV y a un resultado falso positivo a la hora de detectar fracaso terapéutico, cuya principal consecuencia sería, en muchos casos, un cambio de tratamiento innecesario.
4. Al comparar el rendimiento de dos técnicas comerciales de cuantificación de la CV del VIH-1 usando muestras de sangre seca de pacientes infectados por distintas variantes del virus se ha puesto de manifiesto que la cuantificación de la viremia puede también verse afectada por la variabilidad genética del VIH y por el ensayo utilizado, ya que una misma muestra infectada puede presentar valores diferentes cuando se emplean distintas técnicas e incluso se puede llegar a la no detección del VIH en muestras infectadas. Por ello se recomienda utilizar la misma técnica para monitorizar el TAR en el mismo paciente.
5. Los resultados falsos positivos obtenidos en el diagnóstico precoz infantil al comparar 4 técnicas virológicas comerciales pueden llevar a un diagnóstico incorrecto de la infección y a la administración del TAR desde una edad muy temprana a un paciente que no lo necesita. Además, podría conducir a una estimación incorrecta de la tasa de transmisión vertical, lo cual afectaría a la

evaluación de los programas de prevención de la transmisión del VIH de madres a hijos.

6. Teniendo esto en cuenta, es necesario mejorar la sensibilidad y la especificidad de las técnicas virológicas comerciales empleadas para el diagnóstico y monitorización del VIH-1, confirmando los resultados con una segunda técnica siempre que sea posible.
7. El primer estudio epidemiológico del VIH-1 llevado a cabo en una población de mujeres embarazadas de Bata, Guinea Ecuatorial, durante 2012-2013 revela una predominancia del recombinante CRF02_AG y el aumento de la prevalencia de las variantes recombinantes con respecto a estudios anteriores.
8. A pesar de haber sido incluidas en un programa de prevención de la transmisión del VIH de madres a hijos, el 17,4% de las mujeres que participaron en este estudio en Guinea Ecuatorial eran *naïve* para ITIAN, ITINAN e IP. Además, la mitad de las mujeres tratadas presentaban viremia detectable en el momento de toma de muestra, lo cual sugiere una baja adherencia al TAR.
9. La alta prevalencia de MRA a inhibidores de la TI (principalmente ITINAN) refuerza la importancia de realizar una monitorización sistemática de las MDR a ARV en Guinea Ecuatorial para reducir su transmisión y optimizar los regímenes terapéuticos de primera y segunda línea cuando se infectan con virus resistentes.

BIBLIOGRAFÍA |

- Aghokeng AF, Monleau M, Eymard-Duvernay S, et al. (2014) Extraordinary heterogeneity of virological outcomes in patients receiving highly antiretroviral therapy and monitored with the world health organization public health approach in sub-Saharan Africa and southeast Asia. *Clin Infect Dis*; 58:99-109.
- Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, Delaporte E, Peeters M (2011) High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity. *J Clin Microbiol*; 49:1635-1641.
- Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Dimodi H, et al. (2009) Inaccurate diagnosis of HIV-1 group M and O is a key challenge for ongoing universal access to antiretroviral treatment and HIV prevention in Cameroon. *PLoS One*; 4:e7702.
- Aitken SC, Wallis CL, Stevens W, de Wit TR, Schuurman R (2015) Stability of HIV-1 Nucleic Acids in Dried Blood Spot Samples for HIV-1 Drug Resistance Genotyping. *PLoS One*; 10:e0131541.
- Aizire J, Fowler MG, Coovadia HM (2013) Operational issues and barriers to implementation of prevention of mother-to-child transmission of HIV (PMTCT) interventions in Sub-Saharan Africa. *Curr HIV Res*; 11: 144-159.
- Alvarez-Muñoz MT, Zaragoza-Rodríguez S, Rojas-Montes O, et al. (2005) High correlation of human immunodeficiency virus type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions. *Arch Med Res*; 36:382-386.
- Alvarez P, Fernández McPhee C, Prieto L, et al. (2016a) HIV-1 Variants and Drug Resistance in Pregnant Women from Bata (Equatorial Guinea): 2012-2013. *PLoS One*; en prensa.
- Alvarez P, Prieto L, Martín L, et al. (2016b) Evaluation of four commercial virological assays for early infant HIV-1 diagnosis using dried blood specimens. *Pediatr Res*; en prensa.
- Alvarez P, Martín L, Prieto L, et al. (2015) HIV-1 variability and viral load technique could lead to false positive HIV-1 detection and to erroneous viral quantification in infected specimens. *J Infect*; 71:368-376.
- Alvarez P, Rodriguez C, Martin L, del Romero J, Holguín A (2014) HIV-1 RNA Quantification from Dried Blood Spots and plasma Using the Siemens VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR). *Viral Antivir Res*; 3:2.
- Amarakoon II, Ramkissoon A, Pierre R, et al. (2014) HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance in Pregnant Women in Jamaica: A Preliminary Report. *West Indian Med J*; 63:596-600.
- Ambrosioni J, Sued O, Nicolas D, et al. (2015) Trends in Transmission of Drug Resistance and Prevalence of Non-B Subtypes in Patients with Acute or Recent HIV-1 Infection in Barcelona in the Last 16 Years (1997-2012). *PLoS One*; 10:e0125837.
- Badillo-Navarro K, Prieto-Tato L, Obiang-Esomoyo J, Avedillo-Jiménez P, Vargas-Brizuela A, Rojo-Conejo P (2014) [Initial evaluation of a programme to prevent

- mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus infection in Equatorial Guinea]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 32:31-36.
- Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, et al. (2007) HIV-1 Subtype D Infection Is Associated with Faster Disease Progression than Subtype A in Spite of Similar Plasma HIV-1 Loads. *J Infect Dis*; 195:1177-1180.
- Barouch DH (2008) Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*; 455:613-619.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 220:868-871.
- Barth RE, Aitken SC, Tempelman H, et al. (2012) Accumulation of drug resistance and loss of therapeutic options precede commonly used criteria for treatment failure in HIV-1 subtype-C-infected patients. *Antivir Ther*; 17:377-386.
- Barth RE, van der Loeff MFS, Schuurman R, Hoepelman AI, Wensing AM (2010) Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis*; 10:155-166.
- Bartlett JA, Shao JF (2009) Successes, challenges, and limitations of current antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries. *Lancet Infect Dis*; 9:637-649.
- Beloukas A, Psarris A, Giannelou P, Kostaki E, Hatzakis A, Paraskevis D (2016) Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect Genet Evol*; en prensa.
- Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*; 4:e4724.
- Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF (2008) Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther*; 13:25-36.
- Bertagnolio S, Parkin NT, Jordan M, Brooks J, García-Lerma JG (2010) Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: A review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. *AIDS Rev*; 12:195-208.
- Blanche S, Tardieu M, Duliege A, et al. (1990) Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for a bimodal expression of clinical and biological symptoms. *Am J Dis Child*; 144:1210-1215.
- Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ, et al. (1997) Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*; 14:442-450.
- Bland JM, Altman DG (1986) Statistical Methods for Assessing Agreement Between Two Methods of Clinical Measurement. *Lancet*; 327:307-310.

- Bonner K, Siemieniuk RA, Boozary A, Roberts T, Fajardo E, Cohn J (2014) Expanding access to HIV viral load testing: A systematic review of RNA stability in EDTA tubes and PPT beyond current time and temperature thresholds. *PLoS One*; 9:e113813.
- Bonner K, Mezocho A, Roberts T, Ford N, Cohn J (2013) Viral load monitoring as a tool to reinforce adherence: a systematic review. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 64:74-78.
- Bonney EY, Addo NA, Ntim NAA, et al. (2013) Low level of transmitted HIV drug resistance at two HIV care centres in Ghana: a threshold survey. *Ghana Med J*; 47:82-86.
- Brambilla D, Jennings C, Aldrovandi G, et al. (2003) Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: Measurement, precision, and RNA stability. *J Clin Microbiol*; 41:1888-1893.
- Brennan C, Bodelle P, Coffey R, et al. (2008) The prevalence of diverse HIV-1 strains was stable in Cameroonian blood donors from 1996 to 2004. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 49:432-439.
- Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, et al. (2006) HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS*; 20:F9-F13.
- Briones C, Domingo E (2008) Minority report: Hidden memory genomes in HIV-1 quasiespecies and possible clinical implications. *AIDS Rev*; 10:93-109.
- Bruzzone B, Saladini F, Sticchi L, et al. (2015) Prevalence of HIV-1 Subtypes and Drug Resistance-Associated Mutations in HIV-1-Positive Treatment-Naive Pregnant Women in Pointe Noire, Republic of the Congo (Kento-Mwana Project). *AIDS Res Hum Retroviruses*; 31:837-840.
- Bruzzone B, Bisio F, Caligiuri P, et al. (2014) Discordances with HIV-1 RNA quantitative determinations by three commercial assays in Pointe Noire, Republic of Congo. *J Virol Methods*; 203:102-106.
- Buchanan AM, Nadjm B, Amos B, et al. (2012) Utility of rapid antibody tests to exclude HIV-1 infection among infants and children aged <18 months in a low-resource setting. *J Clin Virol*; 55:244-249.
- Cassol SA, Read S, Weniger BG, Pilon R, Leung B, Mo T (1999) Diagnosis and Direct Automated Sequencing of HIV-1 From Dried Blood Spots (DBS) Collected on Filter Paper. *Methods Mol Med*; 17:125-138.
- Cecchini D, Zapiola I, Giuliano SF, Martinez M, Rodriguez C, Bouzas MB (2014) Transmitted drug resistance in women with intrapartum HIV-1 diagnosis: a pilot epidemiological survey in Buenos Aires, Argentina. *J Int AIDS Soc*; 17:19704.
- Ceffa S, Luhanga R, Andreotti M, et al. (2016) Comparison of the Cepheid GeneXpert and Abbott M2000 HIV-1 real time molecular assays for monitoring HIV-1 viral load and detecting HIV-1 infection. *J Virol Methods*; 229:35-39.

- Chang J, Tarasova T, Shanmugam V, et al. (2015) Performance of an Early Infant Diagnostic Test, AmpliSens DNA-HIV-FRT, Using Dried Blood Spots Collected from Children Born to Human Immunodeficiency Virus-Infected Mothers in Ukraine. *J Clin Microbiol*; 53:3853-3858.
- Chantry CJ, Cooper ER, Pelton SI, Zorilla C, Hillyer G V, Diaz C (1995) Seroreversion in human immunodeficiency virus-exposed but uninfected infants. *Pediatr Infect Dis J*; 14:382-387.
- Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M (1986) Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*; 324:691-695.
- Creek T, Tanuri A, Smith M, et al. (2008) Early diagnosis of human immunodeficiency virus in infants using polymerase chain reaction on dried blood spots in Botswana's national program for prevention of mother-to-child transmission. *Pediatr Infect Dis J*; 27:22-26.
- Crowell TA, Hatano H (2015) Clinical outcomes and antiretroviral therapy in "elite" controllers: a review of the literature. *J virus Erad*; 1:72-77.
- da Costa ZB, de Lima YAR, Martelli CMT, Stefani MM de A (2013) Transmitted HIV resistance among pregnant young women infected with HIV-1 in Brazil. *AIDS Patient Care STDS*; 27:439-441.
- De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, et al. (2000) Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA*; 283:1175-1182.
- de Lourdes Teixeira M, Nafea S, Yeganeh N, et al. (2015) High rates of baseline antiretroviral resistance among HIV-infected pregnant women in an HIV referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J STD AIDS*; 26:922-928.
- De Mulder M, Holguín A (2013) [Dried blood spots for monitoring HIV infection in Public Health Programs in developing countries]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 31:100-107.
- de Vijver D, Wensing A, Angarano G, et al. (2005) Differences in the frequency of minor substitutions between HIV-1 subtypes and their potential impact on the genetic barrier for resistance to protease inhibitors. *Antivir Ther*; 10:S145-S145.
- deCamp A, Hraber P, Bailer RT, et al. (2014) Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*; 88:2489-2507.
- Descamps D, Chaix ML, Montes B, et al. (2010) Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006/2007 in France. *J Antimicrob Chemother*; 65:2620-2627.
- Djoko CF, Wolfe ND, Vidal N, et al. (2010) HIV type 1 pol gene diversity and genotypic antiretroviral drug resistance mutations in Malabo, Equatorial Guinea. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26:1027-1031.

- Do T, Duncan J, Butcher A, Liegler T (2011) Comparative frequencies of HIV low-level viremia between real-time viral load assays at clinically relevant thresholds. *J Clin Virol*; 52:S83-S89.
- Dube Q, Dow A, Chirambo C, et al. (2012) Implementing early infant diagnosis of HIV infection at the primary care level: experiences and challenges in Malawi. *Bull World Health Organ*; 90:699-704.
- Emerman M, Malim MH (1998) HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*; 280:1880-1884.
- Erba F, Brambilla D, Ceffa S, et al. (2015) Measurement of viral load by the automated Abbott real-time HIV-1 assay using dried blood spots collected and processed in Malawi and Mozambique. *South African Med J*; 105:1036-1038.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2016) Annual Epidemiological Report 2016 - HIV/AIDS. Stockholm: ECDC. 2016. En: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/aids/surveillance-reports/Pages/Annual-Epidemiological-Report-2016.aspx>.
- European Collaborative Study (1991) Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. *Lancet*; 337:253-260.
- Fernández McPhee C, Álvarez P, Prieto L, et al. (2015) HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius HIV 1/2 confirmatory assay. *J Clin Virol*; 63:66-69.
- Feucht U, Forsyth B, Kruger M (2012) False-positive HIV DNA PCR testing of infants: Implications in a changing epidemic. *South African Med J*; 102:149-152.
- Fiscus S, McMillion T, Nelson J a E, Miller WC (2013) Validation of the Gen-Probe Aptima qualitative HIV-1 RNA assay for diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants. *J Clin Microbiol*; 51:4137-4140.
- Fiscus S, Brambilla D, Grosso L, Schock J, Cronin M (1998) Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by using blood dried on filter paper. *J Clin Microbiol*; 36:258-260.
- Frange P, Galimand J, Vidal N, et al. (2008) New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996-2006 in France: the French ANRS CO06 primo cohort study. *Retrovirology*; 5:69.
- Frederick T, Mascola L, Eller A, Oneil L, Byers B (1994) Progression of Human-Immunodeficiency-Virus Disease among Infants and Children Infected Perinatally with Human-Immunodeficiency-Virus or through Neonatal Blood-Transfusion. *Pediatr Infect Dis J*; 13:1091-1097.
- Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine W, Yoshida M (1988) HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature*; 333:504.
- Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, et al. (1999) Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med*; 341:394-402.

- Geretti AM, Harrison L, Green H, et al. (2009) Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*; 48:1296-1305.
- GeSIDA (2016) Documento de consenso de GeSIDA/Plan nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. En: <http://gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2016/gesida-guiasclinicas-2016-tar.pdf>
- González-Alba JM, Holguín A, Garcia R, et al. (2011) Molecular surveillance of HIV-1 in Madrid, Spain: a phylogeographic analysis. *J Virol*; 85:10755-10763.
- Gonzalez LMF, Santos AF, Abecasis AB, et al. (2008) Impact of HIV-1 protease mutations A71V/T and T74S on M89I/V-mediated protease inhibitor resistance in subtype G isolates. *J Antimicrob Chemother*; 61:1201-1204.
- Gonzalez LMF, Brindeiro RM, Tarin M, et al. (2003) In vitro hypersusceptibility of human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease to lopinavir. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:2817-2822.
- Gottesman BS, Grosman Z, Lorber M, et al. (2004) Measurement of HIV RNA in Patients Infected by Subtype C by Assays Optimized for Subtype B Results in an Underestimation of the Viral Load. *J Med Virol*; 73:167-171.
- Gourlay A, Birdthistle I, Mburu G, Iorpenda K, Wringe A (2013) Barriers and facilitating factors to the uptake of antiretroviral drugs for prevention of mother-to-child transmission of HIV in sub-Saharan Africa: A systematic review. *J Int AIDS Soc*; 16:18588.
- Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, et al. (2004) Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:2159-2165.
- Gueudin M, Plantier JC, Lemée V, et al. (2007) Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime extraction-quantification systems for HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 44:500-505.
- Gueye SB, Diop-Ndiaye H, Diallo MM, et al. (2016) Performance of Roche CAP/CTM HIV-1 qualitative test version 2.0 using dried blood spots for early infant diagnosis. *J Virol Methods*; 229:12-15.
- Hauser A, Kuecherer C, Kunz A, et al. (2015) Comparison of 454 ultra-deep sequencing and allele-specific real-time PCR with regard to the detection of emerging drug-resistant minor HIV-1 variants after antiretroviral prophylaxis for vertical transmission. *PLoS One*; 10:e0140809.
- Havens PL, Mofenson LM. (2009) Evaluation and management of the infant exposed to HIV-1 in the United States. *Pediatrics*; 123:175-187.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*; 25:679-689.

- Hillis DM, Bull JJ (1993) An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst Biol*; 42:182-192.
- Holguín A, Norman F, Martín L, et al. (2013a) Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin Vaccine Immunol*; 20:1197-1202.
- Holguín A, Yebra G, Martín L, et al. (2013b) Transmitted drug-resistance in human immunodeficiency virus-infected adult population in El salvador, central america. *Clin Microbiol Infect*; 19: E523-E532.
- Holguín A, Erazo K, Escobar G, et al. (2011) Drug resistance prevalence in human immunodeficiency virus type 1 infected pediatric populations in Honduras and El Salvador during 1989-2009. *Pediatr Infect Dis J*; 30:e82-e87.
- Holguín A, de Mulder M, Yebra G, López M, Soriano V (2008a) Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res*; 6:327-334.
- Holguín A, López M, Molinero M, Soriano V (2008b) Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J Clin Microbiol*; 46:2918-2923.
- Holguín A, Lospitao E, López M, et al. (2008c) Genetic characterization of complex inter-recombinant HIV-1 strains circulating in Spain and reliability of distinct rapid subtyping tools. *J Med Virol*; 80:383-391.
- Holguín A, de Arellano ER, Rivas P, Soriano V (2006a) Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev*; 8:98-107.
- Holguín A, Sune C, Hamy F, Soriano V, Klimkait T (2006b) Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J Clin Virol*; 36:264-271.
- Imade GE, Sagay AS, Chaplin B, et al. (2014) Short communication: Transmitted HIV drug resistance in antiretroviral-naïve pregnant women in north central Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 30:127-133.
- Jani I V, Meggi B, Mabunda N, et al. (2014) Accurate early infant HIV diagnosis in primary health clinics using a point-of-care nucleic acid test. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 67:e1-e4.
- Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP (2000) High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*; 74:1234-1240.
- Johannessen A (2010) Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings. *Bioanalysis*; 2:1893-1908.

- Johannessen A, Holberg-Petersen M, Lövgården G, et al. (2010) HIV type-1 drug resistance testing on dried blood spots is feasible and reliable in patients who fail antiretroviral therapy in rural Tanzania. *Antivir Ther*; 15:1003-1009.
- Kageha S, Okoth V, Kadima S, et al. (2012) Discrepant test findings in early infant diagnosis of HIV in a national reference laboratory in Kenya: Challenges and opportunities for programs. *J Trop Pediatr*; 58:247-252.
- Kantor R, Katzenstein D (2003) Polymorphism in HIV-1 non-subtype b protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev*; 5:25-35.
- Keiser O, Chi BH, Gsponer T, et al. (2011) Outcomes of Antiretroviral Treatment in Programmes with and without Routine Viral Load Monitoring in Southern Africa. *AIDS*; 25:1761-1769.
- Kessler HH, Hübner M, Konrad PM, et al. (2013) Genotype impact on HCV RNA levels determined with the VERSANT HCV RNA 1.0 Assay (kPCR). *J Clin Virol*; 58:522-527.
- King CC, Kourtis AP, Persaud D, et al. (2015) Delayed HIV detection among infants exposed to postnatal antiretroviral prophylaxis during breastfeeding. *AIDS*; 29:1953-1961.
- Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA, et al. (2005) HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis*; 41:243-251.
- Kiptoo M, Brooks J, Lihana RW, et al. (2013) HIV-1 drug resistance-associated mutations among HIV-1 infected drug-naïve antenatal clinic attendees in rural Kenya. *BMC Infect Dis*; 13:517.
- Kiwanuka N, Laeyendecker O, Quinn TC, et al. (2009) HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *AIDS*; 23:2479-2484.
- Kleshik F, Brooks J, Cosenza C, Battersby TR (2013) Analytical performance of an automated assay quantifying HIV-1 from dried blood spots. *J Clin Virol*; 57:271-273.
- Korber B, Gnanakaran S (2009) The implications of patterns in HIV diversity for neutralizing antibody induction and susceptibility. *Curr Opin HIV AIDS*; 4:408-417.
- Kouri V, Khouri R, Alemán Y, et al. (2015) CRF19-CPX is an evolutionary fit HIV-1 variant exclusively associated with rapid progression to AIDS in Cuba. *Top Antivir Med*; 23:140-141.
- Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. (2006) Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis*; 6:726-732.
- Kuritzkes DR, Lalama CM, Ribaldo HJ, et al. (2008) Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an

- efavirenz-based regimen in treatment-naive HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis*; 197:867-870.
- Lambert JS, Harris DR, Stiehm ER, et al. (2003) Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 34:512-519.
- Larbalestier N, Mullen J, O'Shea S, et al. (2003) Drug resistance is uncommon in pregnant women with low viral loads taking zidovudine monotherapy to prevent perinatal HIV transmission. *AIDS*; 17:2665-2671.
- Lau KA, Wong JJJ (2013) Current trends of HIV recombination worldwide. *Infect Dis Rep*; 5:15-20.
- Lecher S, Ellenberger D, Kim AA, et al. (2015) Scale-up of HIV Viral Load Monitoring - Seven Sub-Saharan African Countries. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 64:1287-1290.
- Leelawiwat W, Young NL, Chaowanachan T, et al. (2009) Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: Stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *J Virol Methods*; 155:109-117.
- Levy JA (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*; 57:183-289.
- Lima YAR, Cardoso LPV, Reis MN da G, Stefani MMA (2016) Incident and long term HIV-1 infection among pregnant women in Brazil: Transmitted drug resistance and mother-to-child transmission. *J Med Virol*; 88:1936-1943.
- Lima V, Harrigan R, Montaner JSG (2009) Increased reporting of detectable plasma HIV-1 RNA levels at the critical threshold of 50 copies per milliliter with the Taqman assay in comparison to the Amplicor assay. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 51:3-6.
- Liu SL, Schacker T, Musey L, et al. (1997) Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol*; 71:4284-4295.
- Llácer Delicado T, Torrecilla E, Holguín A (2016) Deep analysis of HIV-1 natural variability across HIV-1 variants at residues associated with integrase inhibitor (INI) resistance in INI-naive individuals. *J Antimicrob Chemother*; 71:362-366.
- Lofgren SM, Morrissey AB, Chevallier CC, et al. (2009) Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS*; 23:2459-2466.
- Luft LM, Gill MJ, Church DL (2011) HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: Review of current platforms. *Int J Infect Dis*; 15:e661-e670.
- Lynen L, Van Griensven J, Elliott J (2010) Monitoring for treatment failure in patients on first-line antiretroviral treatment in resource-constrained settings. *Curr Opin HIV AIDS*; 5:1-5.

- Manavi K (2008) The significance of low-level plasma HIV viral load on COBAS TaqMan HIV-1 assays for patients with undetectable plasma viral load on COBAS Amplicor monitor version 1.5. *HIV Clin Trials*; 9:283-286.
- Margariti A, Chatzidimitriou D, Metallidis S, et al. (2016) Comparing Abbott m2000 RealTime HIV test and Roche COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV test, v2.0 in treated HIV-1 B and non-B subjects with low viraemia. *J Med Virol*; 88:724-727.
- Maritz J, van Zyl GU, Preiser W (2014) Irreproducible positive results on the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Qual test are different qualitatively from confirmed positive results. *J Med Virol*; 86:82-87.
- Martínez-Cajas JL, Pant-Pai N, Klein MB, Wainberg MA (2008) Role of genetic diversity amongst HIV-1 non-B subtypes in drug resistance: A systematic review of virologic and biochemical evidence. *AIDS Rev*; 10:212-223.
- Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP, et al. (1996) Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *Jama*; 275:606-610.
- McMahon JH, Elliott JH, Bertagnolio S, Kubiak R, Jordan MR (2013) Viral suppression after 12 months of antiretroviral therapy in low- and middle-income countries: a systematic review. *Bull World Heal Organ*; 91:377-385E.
- Merindol N, Berthoux L (2015) Restriction Factors in HIV-1 Disease Progression. *Curr HIV Res*; 13:448-461.
- Ministerio de Sanidad y Bienestar Social. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de laboratorio del VIH/Sida en Guinea Ecuatorial. 1st ed. Malabo: MINSABS. 2009. En:
- Ministerio de Sanidad y Bienestar Social; Ministerio de Economía Planificación e Inversiones Públicas e ICF International; República de Guinea Ecuatorial (2012) Encuesta Demográfica y de Salud (EDSGE-I) 2011. En: <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR271/FR271.pdf>.
- Mofenson LM, McIntyre JA (2000) Advances and research directions in the prevention of mother-to-child HIV-1 transmission. *Lancet*; 355:2237-2244.
- Monleau M, Aghokeng AF, Eymard-Duvernay S, et al. (2014) Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia. *J Clin Microbiol*; 52:578-586.
- Moradigaravand D, Kouyos R, Hinkley T, et al. (2014) Recombination Accelerates Adaptation on a Large-Scale Empirical Fitness Landscape in HIV-1. *PLoS Genet*; 10:e1004439.
- Mouinga-Ondémé A, Mabika-Mabika A, Alalade P, et al. (2014) Significant impact of non-B HIV-1 variants genetic diversity in Gabon on plasma HIV-1 RNA quantitation. *J Med Virol*; 86:52-57.
- Moutouh L, Corbeil J, Richman DD (1996) Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93:6106-6111.

- Muenchhoff M, Madurai S, Hempenstall AJ o, et al. (2014) Evaluation of the NucliSens EasyQ v2.0 assay in comparison with the Roche Amplicor v1.5 and the Roche CAP/CTM HIV-1 Test v2.0 in quantification of C-clade HIV-1 in plasma. *PLoS One*; 9:e103983.
- Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton C V, Lasky LA, Capon DJ (1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*; 313:450-458.
- Mutagoma M, Ndahimana J d'Amour, Kayirangwa E, et al. (2016) Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance among young adults attending HIV counselling and testing clinics in Kigali, Rwanda. *Antivir Ther*; 21:247-251.
- Mwinga K, Vermund SH, Chen YQ, et al. (2009) Selected hematologic and biochemical measurements in African HIV-infected and uninfected pregnant women and their infants: the HIV Prevention Trials Network 024 protocol. *BMC Pediatr*; 9:49.
- Neogi U, Häggblom A, Santacatterina M, et al. (2014) Temporal trends in the Swedish HIV-1 epidemic: Increase in non-B subtypes and recombinant forms over three decades. *PLoS One*; 9:e99390 .
- Neogi U, Gupta S, Rodridges R, et al. (2012) Dried blood spot HIV-1 RNA quantification: a useful tool for viral load monitoring among HIV-infected individuals in India. *Indian J Med Res*; 136:956-962.
- Nettles RE, Kieffer TL, Simmons RP, et al. (2004) Genotypic resistance in HIV-1-infected patients with persistently detectable low-level viremia while receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*; 39:1030-1037.
- Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F. (2004) Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: A pooled analysis. *Lancet*; 364:1236-1243.
- Ortiz M, Sanchez I, Gonzalez MP, et al. (2001) Molecular epidemiology of HIV type 1 subtypes in equatorial guinea. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 17:851-855.
- Ouma KN, Basavaraju S V, Okonji JA, et al. (2013) Evaluation of quantification of HIV-1 RNA viral load in plasma and dried blood spots by use of the semiautomated Cobas Amplicor assay and the fully automated Cobas Ampliprep/TaqMan assay, version 2.0, in Kisumu, Kenya. *J Clin Microbiol*; 51:1208-1218.
- Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) (1998) HIV-1 viral load and CD4 cell count in untreated children with vertically acquired asymptomatic or mild disease. *AIDS*; 12:F1-F8.
- Palombi L, Galluzzo CM, Andreotti M, et al. (2015) Drug resistance mutations 18 months after discontinuation of nevirapine-based ART for prevention of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *J Antimicrob Chemother*; 70:2881-2884.
- Panel de Expertos de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA), Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) SE de IP (SEIP) (2014) Documento de consenso para el seguimiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en relación con la

- reproducción, el embarazo, el parto y la profilaxis de la transmisión vertical del niño expuesto. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 32:310.e1-310.e33.
- Pant Pai N, Shivkumar S, Cajas JM (2012) Does genetic diversity of HIV-1 non-B subtypes differentially impact disease progression in treatment-naïve HIV-1-infected individuals? A systematic review of evidence: 1996-2010. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 59:382-388.
- Pas S, Rossen JWA, Schoener D, et al. (2010) Performance evaluation of the new roche cobas ampliprep/cobas taqman HIV-1 test version 2.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol*; 48:1195-1200.
- Patiño Galindo JA, Torres-Puente M, Gimeno C, et al. (2015) Expansion of the CRF19_cpx Variant in Spain. *J Clin Virol*; 69:146-149.
- Patton JC, Akkers E, Coovadia AH, Meyers TM, Stevens WS, Sherman GG (2007) Evaluation of dried whole blood spots obtained by heel or finger stick as an alternative to venous blood for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in vertically exposed infants in the routine diagnostic laboratory. *Clin Vaccine Immunol*; 14:201-203.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*; 271:1582-1586.
- Pernas B, Grandal M, Mena A, et al. (2014) High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response. *AIDS*; 28:1837-1840.
- Persaud D, Ray SC, Kajdas J, et al. (2007) Slow human immunodeficiency virus type 1 evolution in viral reservoirs in infants treated with effective antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 23:381-390.
- Picat MQ, Lewis J, Musiime V, et al. (2013) Predicting Patterns of Long-Term CD4 Reconstitution in HIV-Infected Children Starting Antiretroviral Therapy in Sub-Saharan Africa: A Cohort-Based Modelling Study. *PLoS Med*; 10: e1001542.
- Pirillo MF, Recordon-Pinson P, Andreotti M, Mancini MG, Amici R, Giuliano M (2011) Quantification of HIV-RNA from dried blood spots using the siemens VERSANT HIV-1 RNA (kPCR) assay. *J Antimicrob Chemother*; 66:2823-2826.
- Powderly WG, Landay A, Lederman MM (1998) Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *Jama*; 280:72-77.
- Prieto-Tato LM, Vargas A, Álvarez P, et al. (2016) [Early diagnosis of human immunodeficiency virus-1 in infants: The prevention of mother-to-child transmission program in Equatorial Guinea]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 34:566-570.
- Pursuing Later Treatment Options II (PLATO II) project team for the Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE), Castro H, Judd A, et al. (2011) Risk of triple-class virological failure in children with HIV: a retrospective cohort study. *Lancet*; 377:1580-1587.

- Pyne MT, Brown KL, Hillyard DR (2010) Evaluation of the Roche Cobas Ampliprep/Cobas Taqman HIV-1 test and identification of rare polymorphisms potentially affecting assay performance. *J Clin Microbiol*; 48:2852-2858.
- Ramirez BC, Simon-Loriere E, Galetto R, Negroni M (2008) Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res*; 134:64-73.
- Rhee SY, Blanco JL, Jordan MR, et al. (2015) Geographic and Temporal Trends in the Molecular Epidemiology and Genetic Mechanisms of Transmitted HIV-1 Drug Resistance: An Individual-Patient- and Sequence-Level Meta-Analysis. *PLoS Med*; 12: e1001845.
- Roberts T, Bygrave H, Fajardo E, Ford N (2012) Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings. *J Int AIDS Soc*; 15:17324.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac J a, et al. (2000) HIV-1 nomenclature proposal. *Science*; 288:492-505.
- Rodríguez-Da Silva A, Miralles C, Ocampo A, Valverde D. (2015) [Prevalence study of the genetic markers associated with slow progression of human immunodeficiency virus type 1 in the Galician population (Northwest of Spain)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. En prensa.
- Rouet F, Liégeois F, Mouinga-Ondémé A, et al. (2011) Current challenges to viral load testing in the context of emerging genetic diversity of HIV-1. *Expert Opin Med Diagn*; 5:183-202.
- Rouet F, Ménan H, Viljoen J, et al. (2008) In-house HIV-1 RNA real-time RT-PCR assays: principle, available tests and usefulness in developing countries. *Expert Rev Mol Diagn*; 8:635-650.
- Rouet F, Chaix M-L, Nerrienet E, et al. (2007) Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA Quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 45:380-388.
- Ruelle J, Jnaoui K, Lefèvre I, Lamarti N, Goubau P (2009) Comparative evaluation of the VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 kinetic PCR molecular system (kPCR) for the quantification of HIV-1 plasma viral load. *J Clin Virol*; 44:297-301.
- Sagna T, Bisseye C, Compaore TR, et al. (2015) Prevention of mother-to-child HIV-1 transmission in Burkina Faso: evaluation of vertical transmission by PCR, molecular characterization of subtypes and determination of antiretroviral drugs resistance. *Glob Health Action*; 8:26065.
- Salou M, Butel C, Konou AA, et al. (2016) High Rates of Drug Resistance Among Newly Diagnosed HIV-infected Children in the National Prevention of Mother-to-child Transmission Program in Togo. *Pediatr Infect Dis J*; 35:879-885.
- Sawadogo S, Shiningavamwe A, Chang J, et al. (2014) Limited utility of dried-blood-and plasma spot-based screening for antiretroviral treatment failure with Cobas Ampliprep/TaqMan HIV-1 version 2.0. *J Clin Microbiol*; 52:3878-3883.

- SEIP-PNS (2016) Documento de consenso sobre tratamiento antirretroviral en niños y adolescentes con infección por el VIH. En: http://www.msc.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/GuiasTAR_octubre2015completasFinal13_10_15.pdf
- Sherman GG, Stevens G, Jones SA, Horsfield P, Stevens WS (2005) Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*, 38:615-617.
- Sibanda EL, Weller IVD, Hakim JG, Cowan FM (2013) The magnitude of loss to follow-up of HIV-exposed infants along the prevention of mother-to-child HIV transmission continuum of care: a systematic review and meta-analysis. *AIDS*, 27:2787-2797.
- Sigaloff KC, Hamers RL, Wallis CL, et al. (2011) Unnecessary antiretroviral treatment switches and accumulation of HIV resistance mutations: two arguments for viral load monitoring in Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 58:23-31.
- Simonds RJ, Brown TM, Thea DM, et al. (1998) Sensitivity and specificity of a qualitative RNA detection assay to diagnose HIV infection in young infants. Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study. *AIDS*, 12:1545-1549.
- SINIVIH (2015) Vigilancia Epidemiológica del VIH y sida en España: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Plan Nacional sobre el Sida. S.G. de Promoción de la Salud y Epidemiología / Centro Nacional de Epidemiología. En: https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/lformeVIH_SIDA_2015.pdf.
- Smit PW, Sollis KA, Fiscus S, et al. (2014) Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis. *PLoS One*, 9:e86461.
- Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, et al. (2006) Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:694-701.
- Somi GR, Kibuka T, Diallo K, et al. (2008) Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania. *Antivir Ther*, 13:77-82.
- Stadeli KM, Richman DD (2013) Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: A systematic review. *Antivir Ther*, 18:115-123.
- Stevens W, Erasmus L, Moloi M, Taleng T, Sarang S (2008) Performance of a novel human immunodeficiency virus (HIV) type 1 total nucleic acid-based real-time PCR assay using whole blood and dried blood spots for diagnosis of HIV in infants. *J Clin Microbiol*, 46:3941-3945.
- Sutcliffe CG, Moss WJ, Thuma PE (2015) False-Positive HIV Test Results in Infancy and Management of Uninfected Children Receiving Antiretroviral Therapy. *Pediatr Infect Dis J*, 34:607-609.

- Swenson LC, Cobb B, Geretti AM, et al. (2014) Comparative performances of HIV-1 RNA load assays at low viral load levels: Results of an international collaboration. *J Clin Microbiol*; 52:517-523.
- Tatarelli P, Taramasso L, Di Biagio A, et al. (2016) HIV-1 RNA quantification in CRF02_AG HIV-1 infection: too easy to make mistakes. *New Microbiol*; 39:150-152.
- Tchiakpe E, Hounto-Ogouyemi A, Diop Ndiaye H, et al. (2016) [Use of dried blood spots in early diagnosis of HIV-1 infection in children born to HIV-infected mothers as part of the prevention of mother-to-child transmission in Benin]. *Bull la Societe Pathol Exot*; 109:155-159.
- Templer SP, Seiverth B, Baum P, Stevens W, Seguin-Devaux C, Carmona S (2016) Improved Sensitivity of a Dual-Target HIV-1 Qualitative Test for Plasma and Dried Blood Spots. *J Clin Microbiol*; 54:1877-1882.
- Thorne C, Newell M-L (2005) The safety of antiretroviral drugs in pregnancy. *Expert Opin Drug Saf*; 4:323-335.
- Tovo PA, de Martino M, Gabiano C, et al. (1992) Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children. *Lancet*; 339:1249-1253.
- Tropan KT, Stelzl E, Violan D, Winkler M, Kessler HH (2009) Evaluation of the new VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR) for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Virol*; 46:69-74.
- UNAIDS (2016a) AIDS by the numbers. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS-by-the-numbers-2016_en.pdf.
- UNAIDS (2016b) Global AIDS update 2016. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf.
- UNAIDS (2016c) On the fast track to an AIDS free generation. 2016. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/GlobalPlan2016_en.pdf
- UNAIDS (2016d) On the fast track to end AIDS. UNAIDS 2016-2012 strategy. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20151027_UNAIDS_PCB37_15_18_EN_rev1.pdf.
- UNAIDS (2015) Progress report on the global plan towards the elimination of new infections among children and keeping their mothers alive. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2774_2015ProgressReport_GlobalPlan_en.pdf
- UNAIDS (2014) Informe nacional sobre los progresos realizados en la lucha contra el VIH/SIDA Guinea Ecuatorial. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/GNQ_narrative_report_2014.pdf.

- Vairo F, Nicastrì E, Liuzzi G, et al. (2013) HIV-1 drug resistance in recently HIV-infected pregnant mother's naïve to antiretroviral therapy in Dodoma urban, Tanzania. *BMC Infect Dis*; 13:439.
- Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, et al. (2006) Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin Infect Dis*; 42:843-852.
- Vercauteren J, Wensing AMJ, van de Vijver D a MC, et al. (2009) Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis*; 200:1503-1508.
- Viljoen J, Gampini S, Danaviah S, et al. (2010) Dried blood spot HIV-1 RNA quantification using open real-time systems in South Africa and Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 55:290-298.
- Violari A, Cotton MF, Gibb DM, et al. (2008) Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N Engl J Med*; 359:2233-2244.
- Von Truchsess I, Harris B, Schätzl HM, Hackett J (2006) The first B/G intersubtype recombinant form of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) identified in Germany was undetected or underquantitated by some commercial viral load assays. *J Med Virol*; 78:311-317.
- Von Wyl V, Kouyos RD, Yerly S, et al. (2011) The role of migration and domestic transmission in the spread of HIV-1 non-B subtypes in Switzerland. *J Infect Dis*; 204:1095-1103.
- Wensing AM, Calvez, V, Günthard HF, et al. (2015) 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*; 23:132-141.
- Wettstein C, Mugglin C, Egger M, et al. (2012) Missed opportunities to prevent mother-to-child-transmission: systematic review and meta-analysis. *AIDS*; 26:2361-2373.
- WHO (2016a) Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208825/1/9789241549684_eng.pdf?ua=1.
- WHO (2016b) Global Action Plan on HIV Drug Resistance 2017–2021. Combating HIV drug resistance, a little known but growing threat. En: http://who.int/hiv/drugresistance/hivdr_darft_gap.pdf
- WHO (2015) What's new in monitoring. HIV treatment and care. En: <http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv2015-monitoring-factsheet/en/>.
- WHO (2014) March 2014 supplement to the 2013 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/104264/1/9789241506830_eng.pdf.
- WHO (2013) Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. 2013. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf.

- WHO (2012a) WHO HIV drug resistance report 2012. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75183/1/9789241503938_eng.pdf?ua=1.
- WHO (2012b) WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75829/1/WHO_HIV_2012.30_eng.pdf?ua=1.
- WHO (2010a) Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. 2010. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44379/1/9789241599764_eng.pdf.
- WHO (2010b) WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44275/1/9789241599085_eng.pdf.
- Wilson D, Keiluhu AK, Kogrum S, et al. (2009) HIV-1 viral load monitoring: an opportunity to reinforce treatment adherence in a resource-limited setting in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 103:601-606.
- Yapo V, Toni T d A, Desmonde S, et al. (2013) Evaluation of dried blood spot diagnosis using HIV1-DNA and HIV1-RNA Biocentric assays in infants in Abidjan, Côte d'Ivoire. The Pedi-Test DBS ANRS 12183 Study. *J Virol Methods*; 193:439-445.
- Yebra G, de Mulder M, Holguín A (2013a) Description of HIV-1 Group M Molecular Epidemiology and Drug Resistance Prevalence in Equatorial Guinea from Migrants in Spain. *PLoS One*; 8: e64293.
- Yebra G, Holguín A, Pillay D, Hue S (2013b) Phylogenetic and demographic characterization of HIV-1 transmission in Madrid, Spain. *Infect Genet Evol*; 14:232-239.
- Yebra G, De Mulder M, Martín L, et al. (2012) Most HIV type 1 non-B infections in the spanish cohort of antiretroviral treatment-naïve HIV-infected Patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J Clin Microbiol*; 50:407-413.
- Yebra G, de Mulder M, Martín L, et al. (2011) Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antiviral Res*; 89:19-25.
- Yebra G, de Mulder M, del Romero J, Rodríguez C, Holguín A (2010) HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res*; 85:409-417.
- Zhang M, Foley B, Schultz A-K, et al. (2010) The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*; 7:25.
- Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol*; 76:11273-11282.
- Zida S, Tuillon E, Barro M, et al. (2016) Estimation of HIV-1 DNA Level Interfering with Reliability of HIV-1 RNA Quantification Performed on Dried Blood Spots Collected from Successfully Treated Patients. *J Clin Microbiol*; 54:1641-1643.

ANEXO I

Recursos en internet

RECURSOS EN INTERNET UTILIZADOS

- CPR (*Calibrated Population Resistance*, Universidad de Stanford, EE. UU.)
<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>
- HIVdb (Universidad de Stanford, EE. UU.)
<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>
- Geno2Pheno (Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Alemania)
<http://www.geno2pheno.org>
- Comet (Centre de Recherche Public de la Santé, Luxemburgo)
<http://comet.retrovirology.lu/>
- Listado de CRF del Laboratorio Nacional de Los Alamos
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- Alineamientos de secuencias VIH del Laboratorio Nacional de Los Alamos
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>
- ClustalX
<http://www.clustal.org/>
- PHYLP (Phylogeny Inference Package)
<http://www.phylip.com/>
- MedCalc Software bvba versión 13.2.2
https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php
- GenBank
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

ANEXO II

Material adicional

LISTADOS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES UTILIZADOS

Listado OMS actualización 2009

Listado IAS-USA actualización 2015

IP	ITIAN	ITINAN	IP <i>mayor</i>	IP <i>minor</i>	ITIAN	ITINAN
L23I	M41L	L100I	D30N	L10V/I/R/F/C	M41L	V90I
L24I	K65R	K101E/P	V32I	V11I	A62V	A98G
D30N	D67N/G/E	K103N/S	M46I/L	G16E	K65R	L100I
V32I	T69D/ins	V106M/A	I47V/A	K20R/M/I/T/V	D67N	K101E/H/P
M46I/L	K70R/E	V179F	G48V	L24I	T69ins	K103N/S
I47V/A	L74V/I	Y181C/I/V	I50L/V	L33I/V/F	K70R/E	V106M/A/I
G48V/M	V75M/T/A/S	Y188L/H/C	I54M/L	E34Q	L74V	V108I
I50V/L	F77L	G190A/S/E	Q58E	M36I/L/V	V75I	E138A/G/K/Q/R
F53L/Y	Y115F	P225H	T74P	K43T	F77L	V179D/F/T/L
I54V/L/M/A/T/S	F116Y	M230L	L76V	F53L/Y	Y115F	Y181C/I/V
G73S/T/C/A	Q151M		V82A/T/F/S/L	I54V/T/A/S	F116Y	Y188C/L/H
L76V	M184V/I		N83D	D60E	Q151M	G190S/A
V82A/T/F/S/C/M/L	L210W		I84V	I62V	M184V/I	H221Y
N83D	T215Y/F/I/S/C/D/V/E		N88S	L63P	L210W	P225H
I84V/A/C	K219Q/E/N/R		L90M	I64L/M/V	T215Y/F/rev	P227C
I85V				H69K/R	K219Q/E	M230L/I
N88D/S				A71V/I/T/L		
L90M				G73C/S/T/A		
				V77I		
				V82I		
				N83D		
				I85V		
				N88D		
				L89M/V/I		
				I93L/M		

ANEXO III

Publicaciones

PUBLICACIONES SURGIDAS DE ESTA TESIS (incluidas al final de este anexo)

Álvarez P, Martín L, Prieto L, Obiang J, Avedillo P, Vargas A, Rojo P, Fernández McPhee C, Sanz Canalejas L, Benito A, Ramos JT y Holguín A. Evaluation of 4 virological tests using DBS for HIV-1 early infant diagnosis. *Pediatric Research*. 2016 (en prensa). IF: 2,76, cuartil 1.

Álvarez P, Fernández McPhee C, Prieto L, Martín L, Obiang J, Avedillo P, Vargas A, Rojo P, Benito A, Ramos JT y Holguín A HIV-1. Variants and Drug Resistance in Pregnant Women from Equatorial Guinea: 2012-2013. *PLoS ONE*. 2016; 11:e0165333. IF: 3,057, cuartil 1.

Álvarez P, Martín L, Prieto L, Obiang J, Vargas A, Avedillo P, Rojo P, Fernández McPhee C, Benito A, Ramos JT y Holguín A. HIV-1 variability and viral load technique could lead to false early infant HIV-1 diagnosis and erroneous virological failure identification using DBS. *Journal of Infection*. 2015;71:368-376. IF: 4,44, cuartil 1.

Álvarez P, Rodríguez C, Martín L, del Romero J y Holguín A. HIV-1 RNA quantification from Dried Blood Spots and plasma using the Siemens VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR). *Journal of Virology and Antiviral Research*. 2014;3(2). IF: 0,8.

OTRAS PUBLICACIONES

Prieto-Tato LM, Vargas A, **Álvarez P**, Avedillo P, Nzi E, Abad C, Guillén S, Fernández-McPhee C, Ramos JT, Holguín Á, Rojo P, Obiang J. [Early diagnosis of human immunodeficiency virus-1 in infants: The prevention of mother-to-child transmission program in Equatorial Guinea]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016: 34:566-570. IF: 2,172, cuartil 3.

Fernández McPhee C, **Álvarez P**, Prieto L, Obiang J, Avedillo P, Vargas A, Rojo P, Abad C, Ramos JT y Holguín A. HIV-1 infection using Dried Blood Spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay. *Journal of Clinical Virology*. 2015;63:66-69. IF: 3,47, cuartil 2.

ANEXO IV

**Características clínicas, variante
VIH-1 y carga viral de las 69
mujeres embarazadas de
Guinea Ecuatorial**

ID	Estado clínico OMS	Tipo de parto	TAR PTMH	TAR	Naïve a ARV	Variante VIH-1	CV corregida (cp/ml)	CV corregida (log ₁₀ cp/ml)	Secuencia PR y/o TI disponible
1	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	No	No amplificado	ND	ND	No
2	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	CRF02_AG	37.440	4,57	Sí
3	Desc.	Cesárea	TARGA	TARGA	No	CRF02_AG	ND	ND	Sí
4	Desc.	Cesárea	TARGA	TARGA	Naïve a ITINAN	G	2.907	3,46	Sí
5	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a ITINAN	No amplificado	ND	ND	No
6	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a ITINAN	No amplificado	774	2,89	No
7	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	CRF02_AG	ND	ND	Sí
8	III	Vaginal	TARGA	TARGA	No	No amplificado	ND	ND	No
9	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	B	774	2,89	Sí
10	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Desc.	No amplificado	774	2,89	No
11	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	F2	1.723	3,24	Sí
12	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	ND	ND	No
13	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	No	No amplificado	774	2,89	No
14	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	CRF02_AG	10.437	4,02	Sí
15	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	CRF02_AG	158.753	5,20	Sí
16	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	ND	ND	No
17	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	ND	ND	No
18	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	CRF02_AG	17.803	4,25	Sí
19	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	ND	ND	No
20	Desc.	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	C	774	2,89	Sí
21	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	1.640	3,21	No
22	I	Vaginal	TARGA	TARGA	No	CRF02_AG	3.033	3,48	Sí
23	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	ND	ND	No
24	I	Cesárea	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	ND	ND	No
25	I	Vaginal	TARGA	TARGA	No	No amplificado	ND	ND	No

ID	Estado clínico OMS	Tipo de parto	TAR PTMH	TAR	Naïve a ARV	Variante VIH-1	CV corregida (cp/ml)	CV corregida (log ₁₀ cp/ml)	Secuencia PR y/o TI disponible
26	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	774	2,89	No
27	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a ITINAN	CRF02_AG	52.709	4,72	Sí
28	I	Cesárea	TARGA	TARGA	Naïve a IP	CRF02_AG	1.324	3,12	Sí
29	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	ND	ND	No
30	II	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	ND	ND	No
31	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	CRF11_cpx	3.179	3,50	Sí
32	I	Vaginal	TARGA	TARGA	No	No amplificado	ND	ND	No
33	I	Vaginal	TARGA	TARGA	Naïve a IP	No amplificado	ND	ND	No
34	Desc.	Cesárea	TARGA	TARGA	No	A3	7.132	3,85	Sí
35	I	Cesárea	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF22_01A1	22.380	4,35	Sí
36	Desc.	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	6.024	3,78	Sí
37	Desc.	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	1.192	3,08	Sí
38	Desc.	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	2.761	3,44	Sí
39	Desc.	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	178.025	5,25	Sí
40	Desc.	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	95.605	4,98	Sí
41	Desc.	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	833	2,92	No
42	I	Cesárea	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF22_01A1	1.661	3,22	Sí
43	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	ND	ND	No
44	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	774	2,89	No
45	I	Cesárea	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	885	2,95	No
46	I	Cesárea	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	2.016	3,30	No
47	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	4.957	3,70	Sí
48	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	1.707	3,23	Sí
49	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	No amplificado	774	2,89	No

ID	Estado clínico OMS	Tipo de parto	TAR PTMH	TAR	Naïve a ARV	Variante VIH-1	CV corregida (cp/ml)	CV corregida (log ₁₀ cp/ml)	Secuencia PR y/o TI disponible
50	I	Cesárea	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	C	3.075	3,49	Sí
51	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	26.354	4,42	Sí
52	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF22_01A1	1.391	3,14	Sí
53	II	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF06_cpx	3.911	3,59	Sí
54	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	URF	2.405	3,38	Sí
55	I	Vaginal	AZT	Monoterapia	Naïve a ITINAN e IP	CRF02_AG	ND	ND	Sí
56	Desc.	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	C	1.148	3,06	Sí
57	Desc.	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	C	2.280	3,36	Sí
58	Desc.	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	No amplificado	ND	ND	No
59	I	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	CRF02_AG	774	2,89	Sí
60	Desc.	Cesárea	Ninguno	Naïve	Naïve	URF	42.878	4,63	Sí
61	I	Cesárea	Ninguno	Naïve	Naïve	No amplificado	774	2,89	No
62	I	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	No amplificado	1.065	3,03	No
63	Desc.	Cesárea	Ninguno	Naïve	Naïve	No amplificado	774	2,89	No
64	I	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	CRF02_AG	15.603	4,19	Sí
65	I	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	CRF02_AG	2.364	3,37	Sí
66	I	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	D	3.054	3,48	Sí
67	I	Vaginal	Ninguno	Naïve	Naïve	CRF22_01A1	1.272	3,10	Sí
68	I	Vaginal	Desc.	Desc.	Desc.	No amplificado	ND	ND	No
69	Desc.	Desc.	Desc.	Desc.	Desc.	No amplificado	ND	ND	No

ID, identificación; OMS, Organización Mundial de la Salud; TAR PTMH, tratamiento antiretroviral recibido durante el programa de prevención de la transmisión madre-hijo; TAR, tratamiento antiretroviral; CV, carga viral; cp/ml, copias de ARN del VIH-1 por mililitro; PR, proteasa; TI, transcriptasa inversa; Desc., desconocido; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido; ITINAN, Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido; IP, inhibidor de la proteasa; TARGA, tratamiento antirretroviral de gran actividad; ATZ, zidovudina; ND, no detectado por kPCR; No, pacientes bajo TAR incluyendo ITIAN, ITINAN e IP. Los pacientes en gris tenían carga viral detectable (>1.000 cp/ml).

ANEXO V

**Resultados genotípicos de las 38
mujeres embarazadas infectadas
por VIH-1 con secuencia
PR y/o TI disponible**

ID	TAR	Naive a			Variante	Resistencia			Mutaciones en TI	Mutaciones en PR
		ITIAN	ITINAN	IP		A ITIAN	A ITINAN	A IP		
2	TARGA	No	No	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	D123E, I135L, I142K, S162A, T165I, F171Y, K173A, Q174K, D177E, T200A, Q207K, R211E, V245Q, K277R, L283I, T286A, E291D, V292T, I293V, L295M, K311R, S322T, I326V, G335D	Q2H, I3V, I13V, K14R, K20I, E35D, M36I, R41K, L63P, H69K, L89M
3	TARGA	No	No	No	CRF02_AG	-	-	Ninguna	PCR negativa	G16E, K20I, E35D, M36I, R41K, H69K, K70R, L89M
4	TARGA	No	Sí	No	G	Ninguna	Ninguna	Ninguna	E53D, I135V, S162A, K173I, Q174K, D177E, I178V, Q207D, R211K, V245Q	I13A, I15V, K20I, E35K, M36L, N37D, R41K, L63P, H69K, K70R, L89I
7	TARGA	No	No	Sí	CRF02_AG	-	-	Ninguna	PCR negativa	I13V, K14R, K20I, G27E, E35D, M36I, R41K, H69K, L89M
9	TARGA	No	No	Sí	B	-	-	Ninguna	I31V, S68G Secuencia TI incompleta	T12K, K14R, I15V, E35D, N37E, L63T, H69Y
11	TARGA	No	No	Sí	F2	Ninguna	Ninguna	Ninguna	S162C, K173A, Q174K, D177E, I178L, Q207G, R211K, V245Q, D250T, A272P, K275R, Q278Y, T286A, V292I, I293V, E297A, D324E, Q334H, G335D	I15V, K20R, E35D, M36I, N37E, R41K, K45R, D60E, L63P, H69R, V75I, L89M, I93V
14	TARGA	No	No	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V35A, K49R, V60I, S162A, K173A, Q174K, D177E, I195L, T200A, Q207E, P243A, V245K, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, S322T, G335D	T12P, I13V, K14R, I15V, G17E, L19I, K20I, M36I, L63P, H69K, P79D, L89M
15	TARGA	No	No	Sí	CRF02_AG	Ninguna	E138A	Ninguna	V35T, E40D, A98S, K122E, D123T, K122E, D123N, I135V, S162A, K173I, Q174K, D177E, I178V, T200A, Q207E, R211K, F214L, V245M, A272P, E291D, V292I, I293V, N306D, S322T, I326V	L10V, I13V, G16E, L19P, K20I, E35D, M36I, R41K, L63I, I64M, H69K, L89M

ID	TAR	Naive a			Variante	Resistencia			Mutaciones en TI	Mutaciones en PR
		ITIAN	ITINAN	IP		A ITIAN	A ITINAN	A IP		
18	TARGA	No	No	Sí	CRF02_AG	M184V	Ninguna	Ninguna	P4S, E6D, V35K, E36D, S48T, K49R, V60I, A98S, K122P, I135V, S162A, E169D, K173T, Q174T, N175Y, D177E, T200A, Q207E, R211I, V245Q, K249Q, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, K311R, E312D, I326V	L10V, I13V, G16E, K20I, M36I, N37D, R41K, L63S, H69K, L89M
20	TARGA	No	No	Sí	C	Ninguna	V179D, G190A	-	I135V, S162C, K173T, Q174R, D177E, T200A, Q207E, R211K, V245Q, E248D, A272P, K277R, T286A, E291D, V292I, I293V, I326V, Q334N, G335D	PCR negativa
22	TARGA	No	No	No	CRF02_AG	-	-	Ninguna	PCR negativa	I13V, K20I, E35K, M36I, R41N, H69K, K70R, L89M
27	TARGA	No	Sí	No	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V90I* , D123E, I135V, S162A, K173T, Q174E, D177E, T200A, Q207T, R211K, V245K, A272P, K281R, T286A, E291D, V292I, I293V, S322T, I326V, G335D	I13V, K20I, E35D, M36I, N37D, R41K, L63P, H69K, T74S, L89M
28	TARGA	No	No	Sí	CRF02_AG	-	-	Ninguna	PCR negativa	I13V, G16E, K20I, E35D, M36I, R41K, H69K, K70R, L89M
31	TARGA	No	No	Sí	CRF11_cpx	Ninguna	Ninguna	Ninguna	I5V, E6D, V35I, S68G, K122P, D123S, I135T, E169D, K173T, D177E, I178L, T200E, I202V, Q207K, R211K, V245Q, E248D, D250E, A272P, K277R, E291D, V292I, I293V, P313T, S322T, I326V, I329V, Q334L, G335D	T12K, G16A, K20R, E35G, M36I, N37D, R41K, D60E, Q61E, I62V, L63I, C67E, H69K, V77I, L89M
34	TARGA	No	No	No	A3	Ninguna	V106I	Ninguna	K11T, V35T, E36A, T39K, K43E, K103Q , K104R, , D123N, K173L, D177E, I178V, V179I, T200A, Q207A, R211K, F214L, V245Q, E248N, D250E, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, E312D, I326V, G335D	L10V, I13V, K14R, M36I, R41K, L63P, H69K, L89M

ID	TAR	Naïve a			Variante	Resistencia			Mutaciones en TI	Mutaciones en PR
		ITIAN	ITINAN	IP		A ITIAN	A ITINAN	A IP		
35	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF22_01A1	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V60I, D121Y, K122E, I135T, E169D, K173T, Q174K, D177E, G196E, Q197H, T200A, Q207A, R211S, I244V, E248N, A272P, L283I, E291D, V292I, I293V, V317A	L10V, I13V, E35D, M36I, N37D, R41K, I62V, L63A, H69K, K70R, T74S, L89M
36	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	-	D121Y, K122E, S162A, K173T, Q174K, D177E, I202V, Q207K, R211E, V245Q, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T	PCR negativa
37	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	K20R, V35T, V60T, I135V, S162A, K173T, Q174H, D177E, T200A, Q207E, F214L, V245Q, K281R, T286A, E291D, V292I, I293V, P294V, S322A, I326V	K20I, M36I, N37E, R41K, K43R, Q61H, L63P, H69K, L89M
38	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	-	K122E, D123S, I135V, S162A, K173A, Q174K, D177E, Q207A, R211K, V245Q, E248D, T286A, E291D, V292I, I293V, P294A, S322A, I326V, G335D	PCR negativa
39	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	M41L	Ninguna	Ninguna	I5N, E28A, K32KR, V35T, E36D, I135V, S162A, S163T, T165I, E169D, K173T, Q174K, D177E, I178M, T200A, Q207E, R211K, V245Q, E248D, S251N, K275Q, V276T, K281R, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, S322T, I326V, Q330R	I13V, G16GE, L19V, K20I, E35D, M36L, N37H, R41K, L63P, H69K, K70KR, L89M
40	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	E28A, V35T, E36D, T107S, K122E, I135V, S162A, E169D, K173T, Q174K, D177E, T200A, Q207E, R211K, V245Q, E248D, S251N, V276T, T286A, E291D, V292I, I293V, E297K, A304E, S322T, I326V, G335D	I13V, L19V, K20I, E35D, M36L, N37H, R41K, H69K, L89M

ID	TAR	Naive a			Variante	Resistencia			Mutaciones en TI	Mutaciones en PR
		ITIAN	ITINAN	IP		A ITIAN	A ITINAN	A IP		
42	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF22_01A1	Ninguna	Ninguna	Ninguna	K122E, D123G, E169D, K173A, Q174K, D177E, G196E, Q207A, R211S, V245T, A272P, V276I, T286A, E291D, I293V, E312D, S322L, I326V, G335D	I13V, E35N, M36I, N37D, R41K, H69K, I72L, L89M
47	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V35T, T39G, D123E, I135V, S162A, K173I, Q174K, D177E, T200A, Q207A, R211K, F214L, V245L, A272P, K281R, T286A, E291D, V292I, I293V, K311R, S322A, I326V, G335D	I13V, G16E, K20I, E35D, M36I, R41K, L63S, H69K, K70R, L89M
48	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V35T, E36D, T39S, I135V, S162A, F171Y, K173A, Q174K, D177E, T200A, Q207E, K238R, K275R, V276I, K281R, E291D, I293V, P294T, E312N, I326L	I13V, I15V, K20I, M36I, R41K, I64M, H69K, L89M
50	Monoterapia	No	Sí	Sí	C	Ninguna	Ninguna	Ninguna	I135V, S162C, K173T, Q174R, D177E, T200A, Q207E, R211K, V245Q, E248D, A272P, K277R, T286A, E291D, V292I, I293V, I326V	I15V, L19V, E35D, M36I, N37S, R41K, D60E, L63T, H69K, L89M, I93L
51	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	W24C, V35T, V90I* , D123E, I135V, S162A, Q174E, D177E, T200A, Q207K, V245Q, A272P, T286A, E291D, V292I, I293V	V11I, I13V, K14R, K20I, E35D, M36I, R41K, L63P, H69K, L89M
52	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF22_01A1	-	-	Ninguna	PCR negativa	T12R, I13V, G16A, L19I, E35D, M36I, N37D, R41K, K43R, H69K, L89M

ID	TAR	Naive a			Variante	Resistencia			Mutaciones en TI	Mutaciones en PR
		ITIAN	ITINAN	IP		A ITIAN	A ITINAN	A IP		
53	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF06_cpx	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V21I, V35T, V60I, K122Q, S162A, K173A, Q174N, D177E, T200A, Q207A, V245Q, E248D, A272P, K277R, T286A, A288T, V292I, I293V, E297A, G335D	I13V, K14R, I15V, K20I, E35D, M36I, R41K, L63T, I64M, H69K, L89M
54	Monoterapia	No	Sí	Sí	URF	Ninguna	Ninguna	Ninguna	K103E , K122E, D123S, I135T, S162H, K173S, D177E, V179I, Q207A, R211K, F214L, V245Q, E248N, D250E, S251C, A272P, K277R, T286A, E291D, I293V, E312D, I326V	L10I, I13V, G16E, K20I, E35K, M36I, N37E, R41K, K43R, R57K, L63V, C67S, H69R, L89M
55	Monoterapia	No	Sí	Sí	CRF02_AG	-	-	D30N	E6A, V35T, E36D, T39L, M41I, G45E, S48T, A62T Secuencia TI incompleta	K20I, M36I, N37D, R41K, H69K, L89M
56	Naive	Sí	Sí	Sí	C	Ninguna	Ninguna	-	V60I, I135V, K173T, Q174R, D177E, T200A, Q207E, R211K, V245Q, E248N, A272P, K277R, T286A, E291D, V292I, I293V, I326V, Q334N, G335D	PCR negativa
57	Naive	Sí	Sí	Sí	C	-	-	Ninguna	V35T, E36A, T39E, S48T, V60I Secuencia TI incompleta	T12A, I15V, L19V, M36I, R41K, L63V, H69K, L89M, I93L
59	Naive	Sí	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V90I* , A98S, S162A, K173I, Q174K, T200A, Q207E, R211K, V245Q, D250E, T286A, E291D, V292I, I293V, P294V, S322T, I326V, G335D	I13V, K20I, E35D, M36I, R41K, L63S, H69K, K70R, L89M

ID	TAR	Naive a			Variante	Resistencia			Mutaciones en TI	Mutaciones en PR
		ITIAN	ITINAN	IP		A ITIAN	A ITINAN	A IP		
60	Naive	Sí	Sí	Sí	URF	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V35T, T39K, K43E, K49R, K64R, D121Y, K122E, I135T, T165I, E169D, K173A, Q174K, D177E, Q207A, R211K, V245N, E291D, V292I, I293V, K311R, E312N	I13V, G16E, K20R, E35D, M36I, N37K, R41K, H69K, K70R, L89M
64	Naive	Sí	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	D123E, S162A, K173A, Q174A, D177E, T200A, Q207E, F214L, V245Q, D250E, S251D, A272P, E291D, V292I, I293V, L310I, S322T, I326V, G335D	I13V, K20I, E35D, M36I, R41K, L63S, I64M, H69K, L89M
65	Naive	Sí	Sí	Sí	CRF02_AG	Ninguna	Ninguna	Ninguna	V35K, E36D, S48T, K49R, V60I, A98S, I135V, S162A, K173T, Q174K, D177E, T200A, Q207E, K238R, V245Q, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, K311R, E312D, I326V, G335D	K20I, M36I, N37D, R41K, L63P, H69K, K70R
66	Naive	Sí	Sí	Sí	D	-	-	Ninguna	K32I, V35T, K49R, V60I, R83K, V118I Secuencia TI incompleta	L10V, I13V, I15V, K20V, M36I, N37D, K43R, R57K, L63S, I64V
67	Naive	Sí	Sí	Sí	CRF22_01A1	-	-	Ninguna	I5V, K11A, E28K, K32E, V35T, T39K, V60I Secuencia TI incompleta	T12S, I13V, K20R, E35D, M36I, N37D, R41K, H69K, L89M

ID, identificación; TAR, tratamiento antirretroviral; ITIAN, inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido; ITINAN, inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido; IP, inhibidor de la proteasa; TI, transcriptasa inversa; PR, proteasa. En azul, cambios en residuos de la TI involucrados en resistencia pero no incluidos en los listados IAS-2015 ni de Bennett. Con asterisco, cambios presentes en virus procedentes de mujeres embarazadas *naive* ausentes en el listado de Bennett de MRT pero incluidos en el listado IAS-2015.